

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MELANOMA HÜCRE HATTINDA (B16F10) BAZI KANSER
KÖK HÜCRE TİPLERİNİN KANSERLEŞMEDEKİ ROLÜ
İLE ANTİPARAZİTER ÖZELLİKTEKİ ETKEN
MADDELERİN HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEN KANSERLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gülşah EVYAPAN

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

ADANA-2021

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MELANOMA HÜCRE HATTINDA (B16F10) BAZI KANSER
KÖK HÜCRE TİPLERİNİN KANSERLEŞMEDEKİ ROLÜ
İLE ANTİPARAZİTER ÖZELLİKTEKİ ETKEN
MADDELERİN HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEN KANSERLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gülşah EVYAPAN

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TDK-2018-10676
no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2021

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, çalışmamın her aşamasında beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. H. Ümit Lüleyp'a,

Doktora eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Halil Kasap, Prof. Dr. Mülkiye Kasap, Prof. Dr. Davut Alptekin, Prof. Dr. Osman Demirhan ve Prof. Dr. Ayfer Pazarbaşı, Prof. Dr. M. Bertan Yılmaz, Dr. Öğretim Üyesi Perçin Pazarıcı'ya ve tez çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. İ. Soner Koltaş'a teşekkür ederim.

Tez süresince, 2211/C öncelikli alanlar doktora burs programı kapsamında maddi destek aldığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Çalışma sürecim boyunca Türk Tıbbi Onkoloji Derneği Ödül Destek Programı P-TTOD-2020-57 Proje numarasıyla tez çalışmamızı destekleyen Türk Tıbbi Onkoloji Derneğine teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu süreçte, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması TDK-2018-10676 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser Tanımı.....	4
2.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri.....	4
2.1.2. Sürekli bölünme yeteneği.....	5
2.1.3. Büyüme Engelleyici Faktörlerden Kurtulma.....	6
2.1.4. Hücre ölüm mekanizmasını atlama.....	6
2.1.5. İnvazyon ve Metastaz.....	8
2.1.6. Hücre Metabolizmasını Yeniden Programlama.....	9
2.1.7. İmmün Sistemden kaçış.....	10
2.1.8. İnflamasyon.....	10
2.1.9. Anjiyogenezis.....	11
2.1.10. Replikatif Ölümsüzlüğü Sürdürme.....	12
2.1.11. Genomik İnstabilite ve Mutasyon.....	12
2.2. Kanser Kök Hücresi.....	13
2.3. KKH'lerin karsinogenez ve tümörogenezdeki rolü.....	15
2.4. WNT/ β -katenin Sinyal Yolağı.....	16
2.5. Notch Sinyal Yolağı.....	17
2.6. Hedgehog Sinyal Yolağı.....	17
2.6.1. PTCH 1 (Patched 1).....	19
2.6.2. SMO (Smoothened).....	19

2.6.3. GLI (Glioma- associated Oncogene 1).....	19
2.7. Kanser de Hedgehog Sinyal Yolağının Rolü.....	20
2.7.1. Tip I - ligand bağımsız sinyalleşme.....	20
2.7.2. Tip II – ligand bağı otokrin / jukstakrin sinyalleşme.....	20
2.7.3. Tip III - ligand bağımlı parakrin sinyalleşme.....	21
2.8. Kanser Kök Hücrelerinde Hedgehog Sinyal Yolağı.....	21
2.9. Melanoma.....	22
2.9.1. Melanoma Kanseri Epidemiyolojisi.....	22
2.9.2. Melanoma kanseri patalojisi ve moleküler mekanizması.....	23
2.10. Metastatik Melanoma.....	25
2.10.1. Melanom metastazlarının oluşumu.....	25
2.11. Melanoma Kök Hücresi.....	26
2.12. Melanoma kanseri ve Hedgehog Sinyal Yolağı.....	27
2.13. Ornidazole.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Araç ve Gereçler.....	29
3.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler.....	29
3.3. Yöntemler.....	30
3.3.1. Melanoma Hücre Hatlarının Hazırlanması.....	30
3.3.2. Hücre Canlılık Testi: Kristal Viyole Boyama.....	30
3.3.3. Hücre Canlılık Testi: MTT.....	31
3.3.4. Hücre Göçü Testi: Yara açma deneyi (wound-healing assay).....	32
3.3.5. DNA hasarının belirlenmesi tek hücre jel elektroforezi- Comet Deneyi....	32
3.4. CD133 Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	33
3.4.1. Manyetik aktive hücre ayırma Sistemi (FACs) ile Hücrelerin Sorting edilmesi.....	33
3.5. Tümör Hücresi Enjeksiyonu için kanser hücrelerinin hazırlanması ve hücrelerin farelere verilmesi.....	34
3.6. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	35
3.6.1. Trizol ile RNA İzolasyonu:.....	35
3.6.2. RNA'dan cDNA Eldesi:.....	36
3.6.3. Real Time PCR aşaması.....	37

3.6.4. Real Time Sonuçlarının Değerlendirilmesi:.....	38
3.7. ELİSA Deneyi.....	38
3.7.1. Doku Homojenizasyonu.....	38
3.7.2. Protein Miktarının Ölçümü (Bradford Protein Assay):.....	39
3.7.3. Elisa Platelerin Hazırlanması ve Absorbans Ölçümü.....	40
3.8. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa No:
Şekil 1. Kanserin ayırıcı özellikleri.....	5
Şekil 2. Memeli hücrelerinde hedgehog sinyal yolağı için basitleştirilmiş model.....	18
Şekil 3. U.S'deki ölüm oranları.....	23
Şekil 4. Ornidazole'un kimyasal yapısı.....	28
Şekil 5. Hazırlanan melanoma hücre solüsyonu insilün enjektörüyle farelere verildi....	35
Şekil 6. Farklı dozlarda Ornidazole uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 7. B16F10 hücre hattında farklı dozlarda Ornidazole uygulamasının 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücre canlılığına etkisini gösteren grafik.....	43
Şekil 8. Ornidazole'un melanoma hücre migrasyonu üzerine etkisi. Üç bağımsız deneyin ortalaması gösterilmektedir.....	44
Şekil 9. A) Hasar dağılımı, kuyruk momenti (kuyruk uzunluğunun ve DNA fraksiyonunun ürünü) olarak ölçüldü. Ortalama kuyruk momenti (μm), yapışan hücrelerdeki hasar dağılımını temsil eder. B) Ortalama kuyruk momenti (μm), hücrelerdeki hasar dağılımını temsil eder.....	45
Şekil 10. B16F10 melanoma kanser hücrelerinde ve CD133+ , CD133- flow sitometri analizi. İnverted faz kontrast mikroskobu altında gözlemlenen A) FACS analiz sonucu B) B16F10 (unsorted), C) CD133 + ve D) CD133- hücreleri.....	46
Şekil 11. unsorted hücreleri (5×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi.....	47
Şekil 12. B16F10 hücre hattından sort edilen CD133- hücreler (5×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi.....	48
Şekil 13. B16F10 hücre hattından sort edilen CD133+ hücreler (1×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi.....	49
Şekil 14. Ornidazole ile tedavi sonrasında, hedgehog yolağı ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafikler, A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ grup.....	50
Şekil 15. Ornidazole'ün melanom kanser hücrelerinde Shh, Ptch1, Smo, Gli1 ve CD133'ün protein ekspresyonu üzerindeki etkileri.	51

Şekil 16. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, kök hücre belirteçleri ve Yamanaka faktörleri ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.....	51
Şekil 17. A) Unsorted B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, Apoptozis ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.....	52
Şekil 18. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.....	53
Şekil 19. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi aracılı apoptozis ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.....	53
Şekil 20. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi aracılı otofaji ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. cDNA kiti bileşenleri ve kullanılan miktarlar.....	36
Çizelge 2. Revers transkripsiyon reaksiyonunun aşamaları.....	37
Çizelge 3. Real Time RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları.....	37
Çizelge 4. RT-PCR için kullanılan ısı döngüsü.....	38
Çizelge 5. RIPA solüsyonu bileşenleri.....	39
Çizelge 6. Protein ölçümü için standartların hazırlanması.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATG	: Otofaji ilişkili
ALDH1	: Aldehit Dehidrogenaz 1
BAX	: BCL2 ilişkili X, Apoptosis Regulatorü
BCL2	: BCL2 Apoptosis Regulator
BRAF	: Protoonkogen B-RAF
BECN1	: Beclin 1
BCC	: Basal Hücre Karsinom
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
CASP	: Kaspaz
CD133	: Farklılaşma Kümeleri 133
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
ER	: Endoplazmik Retikulum
ESC	: Embriyonik Kök Hücre
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
Gli 1	: GLI Family Zinc Finger 1
HIF-1 α	: Hipoksiya Uyarıcı Faktör-1 α
IPS	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
KKH	: Kanser Kök Hücresi
MAP1LC3B	: Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 Beta
MSC	: Melanom Kök Hücresi
mRNA	: Mesajcı Riboz Nükleik Asit
mTOR	: Memeli Rapamisin Hedefi
Ptch1	: Patched 1
p değeri	: Olasılık (probability) Değeri
TGF $-\alpha$	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
RNA	: Riboz Nükleik Asit
SMO	: Smoothened, Frizzled sınıf reseptör
Std	: Standart
Sufu	: Hh sinyal negatif düzenleyiciler
XBP1	: X-Box Bağlanma Protein 1
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

μl : Mikrolitre
 $^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
 μg : Mikrogram



ÖZET

Melanoma hücre hattında (B16F10) bazı Kanseri Kök Hücre tiplerinin kanserleşmedeki rolü ile Antiparaziter özellikteki etken maddelerin Hedgehog Sinyal Yolağı üzerinden Kanserleşme üzerine Etkilerinin Araştırılması

Melanoma, nöral yarıklardan köken alan ve melanin pigmenti üreten melanositlerin transformasyonu sonucu meydana gelen malignant bir tümördür. Kanseri ilişkili ölümlerin %90'ı, metastatik kanseri durumlarında ortaya çıkmaktadır ve melanoma bilinen en ölümcül kanserlerden bir tanesidir. Genel olarak, melanom tüm malign tümörlerin % 1-3'ünü oluşturur ve insidansı her yıl % 6-7 oranında artmaktadır. Melanoma olgularında konvansiyonel tedavilere karşı direncin çok sık meydana gelmesi; Melanoma-spesifik KKH'lerini, KKH'lerini düzenleyici mekanizmaları, sinyal yolaklarını spesifik olarak hedef alan yeni etkili ve seçici terapötik kimyasalların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Çalışmamızda potansiyel olarak daha etkili tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesi amacıyla melanoma kanseri hücre hattından (B16F10) CD133⁺ ve CD133⁻ yüzey belirteçlerine sahip hücreler sorting edilerek farelerde cilt kanseri oluşturulup, kanseri ve kanseri kök hücrelerini ortadan kaldırma yeteneğı olan yeni bileşiklerin ortaya çıkarılması ve tespit edilmesini amaçladık. Çalışmalarımızın bir sonucu olarak Ornidazol ile tedavi edilen deney gruplarımızda Ornidazol'ün fare melanom B16 hücre proliferasyonunu ve göçünü in vitro zaman ve doza bağılı olarak kontrol gruplarına göre inhibe ettiğini ve ayrıca, Ornidazole tedavisinin DNA hasarlarını şiddetlendirdiğini gözlemledik. Dahası fare melanom modeli tümör analizi ile, Ornidazol'ün melanom hacmini düşürdüğünü gözlemledik. Bulgularımız birlikte ele alındığında, Ornidazole'ün melanom ilerlemesini hafiflettiğini ve eşzamanlı olarak Hedgehog sinyal yolağını ve otofaji ekspresyonunu bastırdığını ve apoptozisi indüklediğini gösterdi. Ek olarak Ornidazole'un ER stres aracılı apoptozisi ekspresyonunu indüklediğı ve otofaji ekspresyonunu inhibe ettiğı görüldü. Elde ettiğimiz bulgular Ornidazole'un tümör büyümesi inhibisyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Melanoma, Kanseri Kök Hücresi, Ornidazole, CD133, Hedgehog sinyal yolağı, ER stresi.

ABSTRACT

Investigation of the Role in Some Cancer Stem Cells on Cancer Formation in Melanoma Cell Line (B16F10) and the Effects of Antiparasitic Agents on Cancer Formation Through Hedgehog Signaling Pathway

Melanoma is a malignant tumor that arises from neural clefts and occurs as a result of transformation of melanocytes that produce melanin pigment. 90% of cancer-related deaths occur in metastatic cancer conditions and melanoma is one of the deadliest cancers known. In general, melanoma accounts for 1-3% of all malignant tumors and its incidence increases by 6-7% each year. Frequent resistance to conventional treatments in patients with melanoma; melanoma-specific CSCs and the regulatory mechanisms of CSCs necessitate the development of new effective and selective therapeutic chemicals that specifically target signaling pathways. In our study, in order to identify and develop potentially more effective treatment methods, skin cancer was created in mouse by sorting cells with surface markers CD133⁺ and CD133⁻ from the melanoma cancer cell line (B16F10) in order to reveal and identify new compounds that have the ability to eliminate cancer and cancer stem cells. As a result of our studies, we observed that Ornidazole inhibited mouse melanoma B16 cell proliferation and migration as a dose and time depended manner in vitro compared to control groups in our experimental groups treated with Ornidazole. We also observed that Ornidazole treatment aggravated DNA damage. Moreover, with mouse melanoma model tumor analysis, we observed that Ornidazole reduced the melanoma volume. Taken together, our findings showed that Ornidazole reduced melanoma progression and simultaneously suppressed Hedgehog signaling pathway and autophagy expression and induced apoptosis. In addition, Ornidazole was found to induce ER stress-mediated apoptosis expression and inhibit ER stress-mediated autophagy expression. Our findings show that Ornidazole may play a role in tumor growth inhibition.

Keywords: Melanoma, Cancer Stem Cell, Ornidazole, CD133, Hedgehog signaling pathway, ER stress.

1. GİRİŞ

Dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen Melanom, ikinci en yaygın kanserdir. Melanoma, tüm cilt kanserlerinde en yüksek ölüm oranına sahip olmakla birlikte tedavi başarısızlığının en önemli nedeni ilaç direncidir. Küçük lezyonlar gibi erken tanı, vakaların birçoğunda (% 50) cerrahi rezeksiyon ile tedaviyi mümkün kılarsa da metastatik melanomun prognozu zayıf kalmaktadır¹.

İnsan solid tümörlerinde kanser kök hücrelerinin keşfi, normal melanositlerin biyolojisi ve neoplastik dönüşümü ile melanom hücrelerinin tümörojenite kazanabileceği olası mekanizmaların da daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. KKH (kanser kök hücresi) kendini yenileme, farklılaşma yeteneğine ilave olarak sonsuz çoğalma potansiyeli, beraberinde tümör büyümesiyle sonuçlanmaktadır. Geleneksel anti-kanser tedavileri tümördeki malign hücrelerin çoğunu ortadan kaldırabilmesine rağmen, nüks etme ve ilerlemeden sorumlu olan kemoterapiye dirençli KKH'ye karşı potansiyel olarak etkisizdirler. İnsan malign melanomu, konvansiyonel tedavilere karşı oldukça dirençli olan metastatik bir kanserdir²⁻⁴. Bulgular, KKH'nin tümörün başlaması ve ilerlemesinde, kemoterapi direnci ve insan malign melanomasında terapötik başarısızlıktaki varlığını ve ilişkisini destekler niteliktedir⁵.

KKH'leri, tümörjenik özellikleri ve kendi kendini yenileyebilme sayesinde, farklılaşmış bir hücre klonu oluşturabilme ile tedaviye karşı direnç geliştirme kabiliyetleriyle karakterizedirler. KKH'lerinin yadsınamaz varlığı; hem kanserin nüksetmesi hem de kemo-direnç gelişimi nedeniyle, mevcut kanser tedavisinin önündeki en büyük engel olduğu düşünülmektedir^{6,7}.

Tüm tümörlerde olduğu gibi melanoma tümörleri de, fonksiyonel kök hücre benzeri özelliklere sahip farklı moleküler işaretler içeren heterojen bir alt popülasyonlar içerir. Melanoma hücre hatlarında ve/veya hasta biyopsilerinde KKH tanımlamak için CD133, CD20,CD271, ABC5 ve ALDH1A marker olarak kullanılmaktadır. Yakın tarihli araştırmalar, KKH'lerinin uzak organ kolonizasyonu için gerekli olan göç ve kendini yenileme özellikleri kazandıklarını göstermiştir^{8,9}.

Kök hücreler kendini yenileyebilme ve farklılaşma yeteneklerini kontrol etmek için birçok sinyal yolağını kullanırlar. Bu yolaklar kök hücrelerde oldukça sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur. Bu yolakların olağan dışı etkinlik kazanması veya

düzeninin bozulması KKH'lerinin ortaya çıkmasına neden olur. Sonic hedgehog (Shh), Bmi1, Wnt/ β -catenin ve Notch gibi birçok sinyal yolağının bu süreçte yer aldığı görülmüştür.

Shh sinyal yolağı, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve doku polaritesinin ana düzenleyicisi olup doku ve organ morfogenezinde yer alan korunmuş bir gelişimsel yolaktır. Hedgehog sinyal yolağı, insanlarda görülen birçok kanser oluşumunda kritik role sahip olup gelişim sinyal yollarının önemli bir sınıfını temsil eder. Shh sinyal yolağı ters etkili iki reseptör üzerinden çalışır. Bunlar Patched ve Smoothed reseptörleri olup temel koşullar altında, Patched reseptörleri Smo'yu bastırmaktadır. Hh ligandları Patched'e bağlandığında Smo etkinleşir ve Ci transkripsiyon faktörünün sitoplazmada birikmesine ve daha sonra nükleusa girmesine neden olur. Nükleus içine giren Ci, glioma ile ilişkili onkogen homolog (Gli) transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hedef gen transkripsiyonunun ekspresyonunu sağlamaktadır. Shh yolağının downstream efektörleri olan GLI, çinko parmak transkripsiyon faktörleri ailesinde yer alır. Shh sinyal yolağı onkogenezinin teşvik edilmesinde, tümör büyümesinde ve ilerlemesinde, tümör ilaç direncinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle Shh yolağının çeşitli bileşenleri olan; Shh, Smo ve Gli1 / 2 molekülleri anti-kanser terapileri için uygulanabilir terapötik hedeflerdir¹⁰.

Gli1 veya Patched1 ekspresyonunun upregülasyonu ile ortaya çıkan Shh yolağının aktivasyonu, glioma, medulloblastoma, nöroblastoma, lösemi, gastrik kanserler de dahil olmak üzere solid ve non-solid kanserler ile ilişkilendirilmiştir¹¹.

Bir polycomb çinko parmak proto-onkogeni olan Bmi1, özellikle nöral ve hematopoetik kök hücrelerin kendi kendini yenilemesindeki rolünden dolayı KKH'lerinde yaşamsal bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda, Bmi1 den yoksun olan farelerde KKH'lerinin çoğalamadığı ve farklılaşarak apoptoza girdiği gösterilmiştir¹².

Ornidazol, 1967'de keşfedilen 5-nitroimidazole ailesine ait, ameoba ve trichomonas enfeksiyonlarında kullanılan bir antiprotozoal ajandır. Protozoal ve anaerobların hücre içerisine pasif difüzyon ile girerek hücre DNA'sına bağlanıp DNA sarmalının stabilizasyonu & iplik kırılması ve DNA sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu nedenle, bağırsak amebiazı, amibik karaciğer apseleri, anaerobik enfeksiyonlar, Crohn hastalığı, duodenal ülserler, giardiasis, cerrahi profilaksi, trichominyasis ve vajinitis gibi çeşitli klinik durumların tedavisinde kullanılır¹³.

Kanser vakalarının moleküler teşhisinin tam ve doğru bir şekilde yapılması, izlenecek doğru tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ve hastalığın prognozuyla direkt ilişkisinden dolayı kritik role sahiptir. Ayrıca; Sox2, Oct3/4 ve Nanog gibi Yamanaka faktörlerinin uyarılmış pluripotent kök hücreler ile yakın ilişkisinin kanser kök hücrelerinde de gösterilmiş olması oldukça dikkat çekici ve önemlidir.

Bu çalışmanın en önemli amacı; melanoma kanserlerinde, kanser kök hücre hipotezini test etmek. Bu amaç doğrultusunda literatür çalışmasıyla belirlediğimiz KKH belirteçlerinden CD133 kullanıldı. Antiparaziter amaçlı kullanılan ornidazol'un melanoma daki etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre canlılık testleri, hücre migrasyonu, DNA hasarı ve KKH üzerine etkisi araştırılmıştır. Ornidazol'un KKH üzerindeki etkisinde 2 farklı yol izlenmiştir. Bunlardan birincisi ornidazol'un tümöröenezisdeki rolünden dolayı Hedgehog sinyal yolağı, apoptoz, ER stress yolağı (ER stress ilişkili-apoptoz, ER stress ilişkili- otofaji). İkinci olarak ornidazol'un KKH'lerine etkisini tespit etmek amacıyla; Yamanaka faktörleri olarak bilinen Sox2, Nanog, Oct3/4'nin gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışmamızla ilgili olarak yapılan literatür taramasında, Ornidazol'un melanoma KKH, ve bu KKH'lerinin düzenleyici mekanizmaları üzerine yaptığı etkiler konusunda bir boşluk bulunmaktadır. Bu nedenle deney kurgumuzu, Ornidazole'un in-vitro (melanoma hücre hattı olarak seçtiğimiz B16F10) ve in-vivo olarak etkisini göstermeyi amaçladık. Ayrıca melanoma tedavisinde alternatif moleküler yaklaşımların günümüz tedavi stratejilerindeki önemine vurgu yapmayı istedik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı

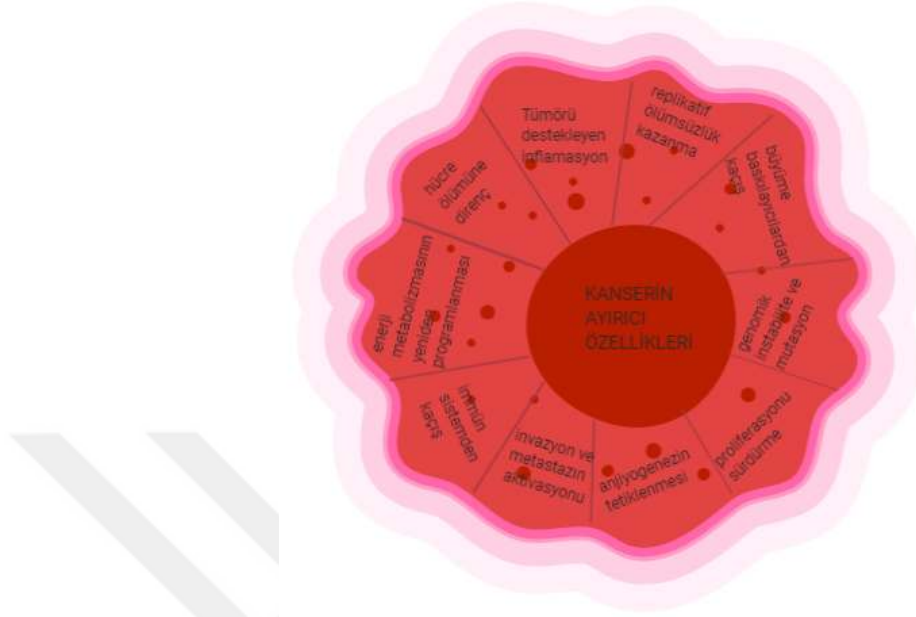
Kanser kavramına her ne kadar ilk olarak Hipokrat tarafından değinildiği vurgulansa da 1922 yılında klasik patoloji kitaplarında ‘vücudun genel yasalarından bağımsız olarak dokunun kütleindeki artış’ olarak tanımlanmıştır. Karkinoma, crab (cangrejo) kelimelerinden köken alan kanser kavramı, bünyesinde taşıdığı anlam itibariyle yengeç şeklinde vücudu saran bir olguyu dile getirmektedir. Kanser kavramıyla eş anlamlı olarak kullanılan tümör kelimesi ise ‘oncos’ kelimesinden köken almış olup, iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) kavramlarını bünyesinde barındırır.

Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak bölünme olgusundaki kontrolün kaybıyla sonuçlanan bir bölünme kusurudur. Kontrolsüz bölünmenin esas olduğu kanser olgusunda, bölünen hücrelerin bulunduğu dokuda sınırlı kaldığı (in-stu) ve komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak yerlere kan-lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan kompleks ve multifaktöryel bir hastalıktır. Kompleks kelimesiyle, mendelyen kalıtım gösteren hastalıklardan farklı olarak çok sayıda genin katılımı ve ilgili genlerin penetrans ve ekspresivitelerindeki değişkenlik tanımlanırken multifaktöryel kavramıyla ise, poligenik ve çevre etkileşiminin olduğu vurgulanır. Bakterilerden virüslere, radyasyondan beslenme alışkanlıklarına, çevremizde sürekli etkileşim halinde olduğumuz kimsyasallar da kansere yol açan mutajenik faktörler olarak bilinir. Kanserle ilgili yapılan bilimsel araştırmalar doğrultusunda her geçen gün kanser hücrelerinin yeni bir özelliği tanımlanmaktadır^{14,6}. 1980- 1990’lı yıllarda kanser hücrelerinin 6 temel özelliği vurgulanırken günümüzde bu özelliklerin sayısı 11’e çıkmıştır.

2.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanser hücreleri genel olarak proliferatif sinyali sürdürme, büyüme engelleyici faktörlerden kaçış, hücre ölümüne direnç, enerji metabolizmasını yeniden programlayabilme ve immün sistemden kaçış, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezisi indüklemeye, invazyon ve metastazı aktive etme, genomik instabilite ve

mutasyon, tümör oluşumuna katkıda bulunan inflamasyon gibi temel özelliklere sahiptir¹⁴.



Şekil 1. Kanser ayırıcı özellikleri.

2.1.2. Sürekli bölünme yeteneği

Normal hücreler, proliferatif duruma geçmek için mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyar. Bu sinyallerin transmembran reseptörleri tarafından hücreye iletilmesi için hücre zarında bir ligandları bulunur. Hücrelerin bölünme döngüsüne girmesini ve büyümesini teşvik eden bu sinyallerin miktar ve yarı ömürleri hücre sayısının dengede kalmasının yanı sıra normal doku mimarisi ve fonksiyonun sürdürülmesi açısından da oldukça önemlidir. Kanser hücreleri ise tipik olarak normal hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen mekanizmalardan ziyade kendilerine hayatta kalma avantajı sağlayan anormallikler gösterir. Kanser hücreleri; ligandlar, liganların reseptörleri ve/veya sitozolik sinyal moleküllerindeki kendi lehine gerçekleşen mutasyonlar aracılığıyla proliferasyonunu sürdürme kabiliyetine sahiptir¹⁴. Genellikle sitoplazmik domainlerinde tirozin kinaz aktiviteleri taşıyan büyüme faktör (GF) reseptörleri, birçok kanserde aşırı şekilde ifade edilir. Reseptörlerin aşırı ekspresyonu, reseptörlere karşılık gelen GF'leriyle aralarında bir kompetisyon yaratarak bölünme konusunda kanser hücresinin daha duyarlı hale gelmesini sağlayabilir. Ayrıca

kanser hücreleri, hücre iskelet yapısındaki destabilizasyonun dışa yansması olarak meydana gelen hücre bağlantı komplekslerindeki zayıflama nedeniyle kontak inhibisyonun bölünme üzerindeki sınırlayıcı özelliğinden yoksun kalarak dur sinyallerine karşı duyarsızlık gösterebilir.

2.1.3. Büyüme Engelleyici Faktörlerden Kurtulma

Hücreler arası bağlantılar; aderans bağlantılar (adherens junctions) sıkı bağlantılar (tight junctions) ve desmozomlar olarak sınıflandırılır ve hücrelerin bir arada tutulması, hücreler arası sinyallerin iletilmesinde ve hücre adezyonunun sağlanmasında rol oynarlar. Kanser hücrelerinde hücresel bağlantılar ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişiklikler, hücre-hücre adezyonunda düzensizlik ve bozulmalar meydana gelir. Hücre adhezyon moleküllerinin azalmış ekspresyonunun bir sonucu olarak, kanser hücrelerinin, diğer hücreler ve doku bileşenleriyle etkileşimleri sınırlandırılmaz ve malign hücrelerin invazyon, metastaz yapma kabiliyetine katkıda bulunur. Ayrıca kanser hücrelerinin azalan yapışkanlığı morfolojik ve hücre iskeletinde değişikliklere neden olmasının yanı sıra, çoğu tümör hücresi kısmen hücre dışı matrise veya komşu hücrelere iyi tutunamadıklarından dolayı normalden daha yuvarlaktır¹⁵.

2.1.4. Hücre ölüm mekanizmasını atlatma

1972 yılında, iskemiye (kanlanma eksikliği) maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan farklı olarak hücre ölümü olduğu gösterilmiş ve buna, Latince "sonbahar mevsiminde ağaç yapraklarının gövdeden dökülmesi" anlamına gelen "apoptosis" [Yunanca: apoptōsis yani "(ayrılarak) düşmek", apo="-den/-dan" ve ptosis="düşmek"] adı verilmiştir. Programlanmış hücre ölümü (Apoptoz) organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinde önemli rol oynayan evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Ayrıca, dengesiz proliferatif sinyaller, aşırı hücre proliferasyonu, doğal niş kaybı ile ilişkili stresler nedeniyle onkogenезin ilk aşamalarında aktive olan ve kansere karşı koruyucu nitelikte bir mekanizmadır. Genel olarak apoptozdan kaçma ve karsinogeneze katkıda bulunan mekanizmalar; 1) bozulmuş pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesi, 2) azaltılmış kaspaz fonksiyonu ve 3) bozulmuş ölüm reseptörü sinyali şeklinde 3 gruba ayrılır. Kanser hücreleri apoptotik kaskadların aktivasyonunu engellemede görevli anti-

apoptik molekülleri aşırı oranda eksprese edebilecek yönde özellik kazandıklarından programlı hücre ölümünden kaçabilirler. Ayrıca kanser hücrelerinin apoptozdan kaçış mekanizması sayesinde kanserleşme yönünde kazanılmış özelliklerin yanı sıra genomlarında, radyasyon ve diğer mutajenik faktörler aracılığıyla meydana gelmiş DNA hasarlarının oğul nesillere aktarılması sağlanarak farklı özelliklerdeki kanser hücre klonlarının oluşumu aracılığıyla direnç gelişiminin de önü açılır¹⁶.

Hücre ölümüne dirençte etkili mekanizmalardan bir diğeri olan otofajinin ise tümör büyümesi ve gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. "Otofaji" geniş anlamda hücre içi ve hücre dışı substratların parçalanmak üzere lizozomlara gönderildiği bir mekanizma olarak tanımlanır. Bu süreç, hücresel homeostazın sürdürülmesi, açlık dönemlerinde canlılığın devamlılığı için amino asit desteği (üretimi) ve patojenlere karşı geliştirilmiş koruma için gereklidir. Otofaji, hücre ölümünü tetiklemesi veya bir sağkalım süreci olarak hareket edebilmesinin yanı sıra, aynı zamanda hem dokuya hem de mikro-çevreye özgü nitelik taşır. Ökaryotlarda otofajinin hücresel mekanizması; nükleasyon, elengasyon maturasyon ve degradasyon olmak üzere 4 aşamaya ayrılır. Beclin 1 (Atg6) ve UVRAG (UV ışınlama direnç-ilişkili gen)'in da dahil olduğu nükleasyon aşamasında otofajik substratları ayırmak için izolasyon membranının oluşur. Elengasyon aşamasında, Atg7 (E1 benzeri enzim) tarafından katalizlenen Atg5 ve Atg12 birleşmesiyle membran izolasyonun otofagozomlar oluşturmak üzere kapanarak, sitoplazmik bileşenlerin ayrı tutulmasına neden olur. Aynı zamanda, pro-LC3 (Atg8), LC3-I oluşturmak için kesilir ve daha sonra LC3-II oluşturmak için ise lipide edilir. Maturasyon aşamasında: Otofagozomlar, otolizozomlar oluşturmak üzere lizozomlarla kenetlenir ve birleşir. Lizozomlarla füzyondan sonra, ayrılan materyallerin hidrolize edildiği otolizozomlar oluşturulur. Otofagozomların ve kargoların iç zarı lizozomal enzimler tarafından degrade edilerek parçalanan ürünler sitozole geri salınır. Normal koşullar altında hücrelerimiz, yeni yapı taşlarının sentezi ve canlılığın devamı için enerji sağlamak amacıyla çevrede, ortamda bol miktarda bulunan makromolekülleri parçalamaktadır¹⁷. Fakat, gelişen tümörlerin yetersiz damarlanmış bölgelerinde meydana gelen besin kıtlığının olduğu koşullar altında, otofaji, eksternal besinler elde edilene kadar sınırlı bir süre canlılığın devamlılığı için hücre içinden besin sağlayan bir mekanizma olarak aktive edilir. Besin kıtlığına ek olarak, metabolik stres ayrıca hipoksiden de kaynaklanır. Solid tümörler,

çok fazla hipoksik olan zayıf damarlanmış bölgeler içerir. Son yapılan çalışmalar, bu bölgelerdeki hücrelerin yüksek düzeyde makrotofaji sergilediğini göstermiştir¹⁸. Yapılan başka bir çalışmada ise otofajinin inhibisyonu ya da otofaji genlerinin susturulmasının tümör hücre ölümü ile sonuçlandığı görülmüştür¹⁹.

2.1.5. İnvazyon ve Metastaz

Tümörler daha malign hale doğru ilerledikçe, kanser hücreleri sıklıkla göç etme yeteneklerini ve çevredeki dokuyu istila etme kapasitesini geliştirir. Tümör hücrelerinin bu uzak yerleşimleri (metastazları) insan kanser ölümlerinin% 90'ının sebebidir ve invazyon-metastaz kaskadı bir dizi olaylar serisini bünyesinde barındırır. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT), hücrelerin farklılaşma, uzak odağa göç ve yeni bir yapılanmayı oluşturacak asıl hücreye yeniden farklılaşma sürecini içeren geçici ve geriye dönüşümlü bir süreçtir. Kanser hücrelerinin uzak bölgelerde lokalize olmaları için 1) bazal membranı ve stromal hücreler de dahil olmak üzere hücre dışı matriks (ECM) yoluyla istila etmesi, 2) tümör vaskülatürüne penetre olması, 3) İntravazasyon (kan ve lenf damarlarına girmesine) ve dolaşımda taşınmayı sürdürmesi, 4) uzak organların parankiminde ekstrasvazat (tümör hücrelerinin endoteli aşırıp organlara ulaşması) olması 5) oluşturarak hayatta kalması ve mikrometastaz oluşturan yabancı mikro ortamları manipüle etmesi gerekir.

İnvazyon (komşu dokuları istila) ve metastaz (uzak dokulara yayılma) yeteneği, kanser hücrelerinin birincil tümör kütlelerinden kaçmasına ve vücutta, besinlerin ve alanın sınırlayıcı olmadığı yeni dokularda kolonileşmesine olanak tanır. Buna genellikle yapışma, hücre polaritesi, hücre iskeleti dinamikleri ve morfolojideki değişiklikler eşlik eder. Lokal invazyonun ayrılmaz bir parçası da, matriks metaloproteinazların (MMP'ler) olduğu ECM'nin bozulmasıdır²⁰. Bu endopeptidazlar yalnızca invazyona katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda hücre proliferasyonu, hayatta kalma, immün yanıt ve anjiyogenezde de rol oynarlar²¹.

İnvazyon ve metastaz kan, büyüme faktörleri, kemokinler, adhezyon reseptörleri ve düzensiz sinyalleşme için hedef olan diğer uyaranlar tarafından düzenlenir. PI3K-Akt ve Ras-ERK yolları, çok sayıda downstream efektörü aracılığıyla migrasyon ve invazyonu düzenler. Hem Ras-ERK hem de PI3K-Akt sinyal yollarındaki düzensizlik,

invaziv bir fenotipin adaptasyonunu teşvik ederek onkogenezin ilerlemesinde önemli bir rol oynama potansiyeline sahiptir²².

2.1.6. Hücre Metabolizmasını Yeniden Programlama

Metabolizmanın yeniden programlanması, hem tümörün inisiyasyonu hem de progresyonu açısından benzersiz şekilde seçici bir avantaj sağlar. Pavlova ve Thompson kısa bir süre önce, glukoz ve amino asit alımlarının yeniden düzenlenmesi, fırsatçı besin kazanımı, glikoliz ve TCA döngüsü ara ürünlerinden yararlanma, artan nitrojen talebi, metabolit kaynaklı gen düzenlemesinde değişiklikler ve metabolik etkileşimde olan mikroçevre olmak üzere kanser metabolik değişikliklerini, tamamen veya kısmen farklı tümör ortamlarında mevcut olabilen altı özelliğe ayırmıştır²³.

Hücre büyümesinin, makromoleküllerin sentezinde yer alan metabolik süreçlerle koordine edilmesi gerekir. Bu nedenle, hem normal hem de tümör hücrelerini düzenleyen büyüme faktör yolları, yeni yavru hücreler üretmek için makromoleküllerin sentezine olan artan ihtiyacı karşılamak üzere metabolik yollara etki eder. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresörlerin kaybı, büyüme faktörlerinin yokluğunda dahi metabolik yolları kendi lehine yeniden programlayarak düzenleyebilir. Kanser hücrelerindeki en yaygın metabolik değişiklik, artan glukoz alımı ve glikolizdir. Kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile anaerobik glikolizi tercih ettiği yaklaşık yüzyıl önce Otto Warburg tarafından tanımlandığı için, "Warburg etkisi" olarak bilinmektedir. Bu etki göz önüne alınarak kanser hücrelerinin yüksek metabolik aktivitelerinin izini sürerek tümör odaklarının bulunması amacıyla geliştirilmiş olan [18F] florodeoksiglukoz, pozitron emisyon tomografi tarayıcılarında (PET) gösterilmiştir²⁴. İlk bakışta oksidatif fosforilasyona kıyasla, glikoliziste daha az ATP üretilmesi bir dezavantaj olarak görülebilir. Ancak bu olay hücrelerin karbon iskeletini, redox homeostazisini düzenleyen ve nükleotid sentezine öncülük eden pentoz fosfat yolağı gibi yolların, glikolizisten anabolik reaksiyonlara yönlendirmesine izin veren özelliği nedeniyle kanser hücreleri tarafından tercih edildiği gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin bu metabolik tercihlerine ilave olarak proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin sentezini ve oksidatif fosforilasyonu desteklemek için artmış glutamin alımı ve glutaminolizise sahip olduğu gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalar, kanser

hücrelerinin yeniden metabolik programlanması çerçevesinde yağ asit sentezini, krebs döngüsünden sitrata yönlendirerek lipid sentezini yeniden düzenlediği gösterilmiştir¹⁵.

Yeni bir teori olan, Kim'in sitosolik NADH teorisine göre; karbonhidrat, yağ asidi, glutamin kullanılarak sitozoldeki NADH üretiminin MAS (malate-aspartate shuttle) aracılığıyla mitokondriye transportunun, kanser hücrelerindeki ATP üretiminde önemli rol oynadığına dair yeni bir teori öne sürülmüştür²⁵.

2.1.7. İmmün Sistemden kaçış

Vücutta bağışıklık sistemi ve tümör hücreleri arasında dinamik bir denge mevcuttur. İmmün hücre reaksiyonunun durdurulması ya da yavaşlatılması kanser gelişimi, büyümesi ve metastazı için en önemli özelliklerden biridir. Tümör hücreleri, iki ana strateji kullanarak immün sistemin saldırısından kaçarlar: immün tanımadan kaçınma ve immün baskılayıcı bir tümör mikroçevresini teşvik etme. Birincisinde, kanser hücreleri, immün yontu olarak tanımlanabilecek süreç kapsamında immün sistem tarafından hücre yüzeyindeki tümör antijenlerine sahip olan klonların tanınıp yok edilmesi neticesinde ekspresyonunu kaybederek immün gözetimden elimine olarak (immün eliminasyon) kaçabilir. İkincisinde ise; IL-10, TGF-, prostaglandin E2 ve VEGF gibi baskılayıcı moleküllerin salgılanması, VISTA (V domaini immünoglobulin supresör T-hücre aktivasyonu), PD-L1 ve CTLA-4, gibi inhibe edici kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu, TAM (tümör ilişkili makrofaj) MDSC'lerin (miyeloid kökenli süpresör hücreler) ve Treg'lerin tümör kökenli CCL2, CSF1, CCL5, CCL22, CXCL5, CXCL8 ve CXCL12 gibi kemokinler tarafından alınmasının indüksiyonu gibi kanser hücre kökenli faktörler aracılığıyla immün toleranslı bir tümör mikroçevresi oluşturulur. Tüm bu stratejiler biraraya geldiğinde ise immün sistemden kaçış olarak tanımlanan immün escape gerçekleşir²⁶⁻²⁸.

2.1.8. İnflamasyon

Yangısal cevap olarak bilinen inflamasyon, normal koşullarda zararlı uyarınları ortadan kaldıran ve doku homeostazisini geri kazandıran koruyucu bir yanıt olarak rol oynar. Ancak uzun süreli enflamasyon ise malignitelerin gelişmesine katkı sağlayan bir

süreçtir. Tümörlerin enflamatuar mikroçevresi, hem stromayı destekleyici hem de tümör alanlarında konakçı lökositlerin varlığı ile karakterize edilir. Tümörjenezin farklı aşamalarında bulunan kanserle ilişkili inflamasyon, genomik instabiliteye, epigenetik modifikasyona, kanser hücresi proliferasyonunun indüksiyonuna, kanser anti-apoptotik yolların artmasına, anjiyogenezin uyarılmasına ve nihayetinde kanserin yayılmasına katkıda bulunur. Ayrıca, enflamatuar hücreler, etrafındaki kanser hücreleri için aktif olarak mutajenik olan kimyasalları, özellikle reaktif oksijen türlerini salarak artan malignite koşullarıyla kanser hücrelerinin genetik evrimini hızlandırabilir¹⁴. Tümör infiltre eden lenfositler, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve tümörle ilişkili nötrofiller (TİN) olmak üzere üç ana türü bulunmaktadır.

TAM'lar, klasik olarak aktive edilmiş M1 makrofaj ve alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofaj olmak üzere 2 alt tipe ayrılır. M1 makrofajlarının temel görevi, hücre ölümü ve fagositozdur ancak M2 makrofajlar dokunun yeniden şekillenmesi ve immün modülasyonda görev alırlar. M1 makrofajlar, proinflamatuvar mediatörler ve reaktif oksijen radikallerinin sentezi ile mikrobisidal ve tümörisid aktivite gösterirken, M2 makrofajlar ise yüksek miktarlarda IL-10, TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinlerin salgılamasında görev aldıkları için immünsüpresif karakterdedir. Tümör mikroçevresinin kritik bir bileşeni olarak TAM'ların, tümör büyümesini, tümör anjiyogenezini, immün regülasyonunu, metastazı ve kemo-direnci etkiledikleri gösterilmiştir²⁹.

2.1.9. Anjiyogenezis

Tüm dokular gibi, tümörler de kan kaynağına ihtiyaç duyar. Bunu, genellikle yara iyileşmesinde işlev gören yolların yeni kan damarları (anjiyogenez) oluşturmak için endotel hücrelerinin çoğalmasını ve toplanmasını indükleyerek yaparlar. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiyogenin dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) - α , TGF- β , tümör nekroz faktörü (TNF) - α , trombosit kaynaklı endotelial büyüme faktörü, granülosit kolonisi uyarıcı faktör (GM-CSF), plasental büyüme faktörü, interlökin-8, hepatosit büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü gibi bir düzineden fazla farklı protein anjiyogenik faktör olarak tanımlanmıştır. Anjiyogenezin merkezi, VEGF, PDGF, FGF'ler, interlökin (IL) 8

ve anjiyopoietin gibi sinyallerdir. PI3K-Akt yolu, damar bütünlüğünün yanı sıra anjiyogenezin indüksiyonunu da düzenler. Bazı anjiyogenik fenotipler, büyüyen tümör hücreleri ile kılcal damarlar arasındaki mesafenin artışından veya yeni damarların yetersizliğinden kaynaklanan hipoksi tarafından tetiklenebilir. Hipoksi, hipoksi indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α) yoluyla VEGF ve reseptörünün ekspresyonunu indükler ve tümör hücreleri, VEGF üretilmesini sağlayarak yeni kan damarlarının oluşumunda rol alır³⁰.

2.1.10. Replikatif Ölümsüzlüğü Sürdürme

Normal hücreler (kök hücreler hariç) sınırlı sayıda bölünme yeteğine sahiptir. Maksimum çoğalma sayısı Hayflick Limiti olarak adlandırılır. Belirli bir süre bölündükten sonra (Hayflick limitine eriştiğinde) senescence adı verilen yaşlılık dönemine girerler. Bu duruma ise telomerlerin kısalması sebep olmaktadır. Çoğu kanser hücrelerinin telomeraz aktivitesi kazanmasında; telomer koruma mekanizmasını aktive ederek mi yoksa kanser kök hücrelerinin bir yansıması olarak mı sınırsız çoğalma yeteneğine sahip olduğu konusunda iki farklı görüş bulunmaktadır³¹. 1994 yılında Kim ve ark. hücre ve dokulardaki telomeraz aktivitesinin tayininde kullanılmak üzere TRAP (Telomerik Tekrarların Çoğaltılması) yöntemi geliştirmiş ve 24 farklı kanser türünde çalışarak, kanser ile telomeraz ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir³². Ek olarak 1996 yılında Shay ve Wright'in yaptıkları bir çalışmada ise malign tümörlerin % 85'inin telomeraz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur³³.

2.1.11. Genomik İnstabilite ve Mutasyon

Genomik instabilite, kanser hücrelerinin yaygın bir özelliğidir. Birçok kanser türünde anöploidi ve büyük ölçekli DNA yeniden düzenlemeleri söz konusu olduğu için yüksek mutasyon oranları görülür. Normalde, çeşitli hücresel enzimler DNA hasarını onarır ve kontrol noktası sinyalleri, potansiyel olarak zarar verici hatalar düzeltilene kadar bölünen hücrelerde DNA replikasyonunun ve sitokinezin durdurulmasını sağlar, böylece etkilenen hücreler bu hataları aktaramaz. Genomik istikrarsızlığın kanserin bir nedeni mi yoksa bir sonucu mu olduğu hala tartışılmakla birlikte, kontrol noktası

sinyalizasyonunun ve/veya DNA onarım mekanizmalarının başarısız olduğu gerçeğini bünyesinde taşır¹⁵.

Tümör dokusu içerisinde yer alan kanser hücrelerinin heterojen yapısıyla özdeşleşmiş çok sayıda farklı mutasyonlar onkogeneze sürecine eşit derecede katkı yapmazlar. Kanser gelişiminde kritik role sahip olan mutasyonların olduğu genler driver (sürücü) gen olarak tanımlanırken, ikincil ve üçüncül derecede katkı yapan genler ve mutasyonları için passenger (yolcu) tanımlaması yapılmıştır. Yapılan çalışmalar driver mutasyonlarının passenger mutasyonlarına kıyasla %25'ini temsil ettiğini göstermiştir. Bu özellikteki driver gen mutasyonları, kanser hücrelerine seçici büyüme avantajının yanısıra, kanser hücresinin büyümesi ve hayatta kalması için kritik rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde ortaya çıkması nedeniyle de kanser gelişimini destekler. Proto-onkogen ve tümör supresör gibi önemli genleri kapsayan driver mutasyonları, ilgili proteinlerin fonksiyonlarını inaktive/aktive ederek bozar. Ayrıca kanseri etkileyen genlerin promotörler bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyon durumundaki değişiklikler de onkogeneze önemli bir rol oynayabilir³⁴.

Epstein Barr Virüsü (EBV), İnsan T-lenfotropik Virus (HTLV) ve Human Papilloma Virüsü (HPV) gibi sınırlı sayıda kanserlerin gelişiminde tümör promotörü olarak görev yapan biyolojik ajanların yanısıra Hepatit B (HBV), Hepatit C (HCV), Kaposi Sarkom ilişkili Herpes (KSHV) ve HIV virüsü gibi immün sistemin baskılanması sonucu kanserin gelişimine yardımcı olan virüsler söz konusudur³⁵.

2.2. Kanser Kök Hücresi

Kök hücreler, kendi kendini yenileme kapasitesi ve çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma yeteneği ile karakterize edilir. Kök hücrelerin kanserdeki rolüne dair ilk bilimsel kanıt, 1994 yılında, insan akut miyeloid lösemi (AML) hastalarından, AML başlatıcı bir hücre popülasyonunun şiddetli kombine bağışıklık yetmezliği olan (SCID) farelere transplantasyonu yoluyla tanımlanmıştır³⁶. 2003 yılında insan KKH'leri; göğüs ve beyin kanseri gibi bazı solid tümörlerde tanımlanmış olup³⁷ daha sonra, kolon, pankreas, akciğer, prostat, melanom ve glioblastom da dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde de tanımlanmıştır³⁸. Kök hücre kavramı, embriyonik kök hücreler (ESC'ler), yetişkin kök hücrelerden, kanser kök hücrelerine (KKH'ler) ve uyarılmış pluripotent kök

(IPS) hücreleri de kapsayacak şekilde geniş bir kavram yelpazesine sahiptir³⁹. Kök hücrelerin asimetrik ve simetrik bölünme tipleri, değişen ortam koşullarına göre kök hücre havuzunun korunarak farklılaşması veya korunmadan farklılaşması şeklinde gerçekleşen özel bir bölünme şeklidir. Kanseri kök hücreleri (KKH'ler), tümör büyümesi ve heterojenitesinde etkili olan, kendi kendini yenileme ve birçok soya farklılaşma gibi özellikler nedeniyle normal kök hücre veya progenitör hücreler ile ortak özellikler gösterirken, kanser hücrelerinin bir alt popülasyonları olması nedeniyle de onlardan ayrılır⁴⁰. KKH tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmamış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. KKH'lerin kökeni ile ilgili 3 hipotez ortaya atılmıştır.

- 1) KKH, kök hücrelerden kaynaklanmaktadır: tümör oluşumuna neden olacak farklı mutasyonların meydana gelebilmesi için normal kök hücrelerin tüm dokularda bulunması ve uzun bir ömre sahip olmasının bunu mümkün kılabileceğini varsayan bir görüştür. Çoğu kanser kök hücresinde ifade edilen CD133 ve ALDH1 gibi kök hücre belirteçlerinin bulunması bu görüşün en güçlü yanıdır. Örneğin, lösemiye neden olan hücrelerin birçok özelliği bu varsayımı destekler niteliktedir⁴¹.
- 2) KKH, progenitör olarak tanımlanan öncü hücrelerden köken alır: Öncü hücreler fetüs ya da yetişkin dokusunda bulunan kısmen farklılaşmış olgun hücreleri oluşturmak üzere bölünürler. Progenitör hücrelerin birçok farklı dokuda ve fazla miktarda bulunmasına koşut, kök hücrelere oranla kısmen kendini yenileme kapasitesine sahip olmaları bu hücrelerin kanserin kaynağı olabileceğini düşündürmüştür⁴¹.
- 3) IPS'in keşfinden sonra ileri sürülen başka bir hipotez de ise, sınırlı bir ömrü olan farklılaşmış vücut hücrelerinin kök hücre özelliği kazanarak farklılaşması sonucunda (farklılaşmanın kalkması) KKH haline dönüşebileceğini ileri süren bir görüştür. Bu varsayımına göre farklılaşmış hücreler bir takım mutasyonlarla geriye doğru farklılaşıp tekrar kendini yenileme özelliği kazanmakta ve yaşam sürelerini uzatmaktadırlar. Bu durumda mevcutta tümör oluşturabilme ihtimali olan birçok hücre olacaktır.

Ancak henüz hücrelerin yeniden programlanmasını sağlayacak bir mekanizma gösterilememiştir^{41,42}.

Kök hücre devamlılığı için gerekli olan; oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), cinsiyet belirleme bölgesi Y-kutusu 2 (SOX2) ve Nanog homebox (NANOG) gibi transkripsiyon faktörleri hem embriyonik kök hücrelerin kendini yenileme ve pluripotensinin sağlanmasına hemde tümör proliferasyonu ve tümör farklılaşmasına aracılık etmektedirler⁴³.

Tümör dokusu içerisinde KKH'lerinin farklılaşmasında etkili olan sinyal yollarının normal kök hücreler tarafından da kullanılıyor olması ve bu sinyal yollarının inhibisyonunu hedefleyen tedavi stratejilerinin klasik tedavilerden daha başarılı sonuçlar verdiğinin gözlenmesi dikkatleri sinyal yolları üzerine çekmiştir.

2.3. KKH'lerin karsinogenez ve tümörgenezdeki rolü

Tümör yapısının hiyerarşik organizasyonuna veya kanser kök hücre modeline göre, KKH'ler, normal bir yetişkin kök hücreye benzer şekilde kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelini taşımakla birlikte tümör dokusu içerisinde yer alacak kanser hücrelerinin oluşumundan sorumludur. Son kanıtlar ve araştırmalar, sindirim sistemi kanserlerini de içeren birçok solid tümörün başlaması için hiyerarşik yapıya sahip kanser kök hücre modelini desteklemiştir. Benzer şekilde meme tümörleri, gliyomalar, melanomlar, prostat kanseri ve osteosarkomda belirlenen KKH'nın varlığı “kanser kök hücre teorisi” nin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir. Belirgin bir şekilde, kanser kök hücrelerinin, tümörün başlamasındaki önemli rolleri dışında, uzak metastaz oluşumunda da ana sorumluluğu vardır. KKH'lerin farklılaşma ve hayatta kalma özellikleri sayesinde kullanılan klasik birçok kemoteröpatik ajanlara karşı direnç geliştirme ve nüks sonrası artan metastatik özellikleri nedeniyle tedavi stratejilerinde değişiklik yapılarak KKH'lerinin hedeflenmelerini zorunlu hale getirmiştir⁴⁴. Ayrıca son çalışmalar, kanserin epigenetik modifikasyonlarla korunan ve dikkatlice düzenlenen genetik bir hastalık olduğu hipotezini doğrulamıştır. Kanser kök hücrelerinin tümör yapısının ve heterojenliğin oluşumuna yönelik anlayışa destek olan mevcut gelişme, kanser kök hücrelerinin moleküler yolları, onları temel düzenleyici yollarda düzenleyen genetik

ve epigenetik mekanizmalar bu alandaki en önemli kategoridir⁴⁵. Son yıllarda beyin, meme, prostat, baş ve boyun, pankreas, karaciğer, yumurtalık, melanom, deri ve kolon kanseri gibi insan solid tümörlerinde ALDH1 ekspresyonu ve CD133, CD44, EpCAM, CD24, Lgr5 dahil farklı yüzey kök hücre markerleri, veya DNA boyasını ekstrüde etme yeteneği (yan popülasyon hücreleri) kullanılarak KKH'leri tanımlanmıştır⁴⁶. Bu tanımlama da kullanılan belirteçlerin normal kök hücrelerde de bulunuyor olmasının getirdiği dezavantajların ortadan kaldırılması için daha ayırıcı belirteçlerin tanımlanarak kullanımının önemi artmıştır.

Farklılaşma ve bölünmenin esas olduğu onkogeneze sürecinde rol oynayan sitokinler, Hedgehog, Notch ve Wnt/ β -catenin yollarının embriyonik sürecin dışında yanlış zamandaki aktiviteleri, KKH'lerinin kanser mikroçevrelerindeki farklılaşmasında oynadığı düzenleyici rol nedeniyle oldukça önemlidir⁴⁷.

2.4. WNT/ β -katenin Sinyal Yolu

Wnt1 geni ilk olarak 1980'lerin başlarında *Drosophila melanogaster*'da gelişimsel modellerde tanımlanmıştır⁴⁸. WNT/ β -katenin sinyal yolu, transkripsiyon faktörü β -katenin aracılığıyla gen aktivasyon süreçlerini kontrol eder ve yönetir. Böylece, WNT sinyali olmadığında, sitoplazmik β -katenin, APC (Adenomatöz polipoz koli), GSK-3 β (Glikojen sentaz Kinaz 3 β), Axin ve ayrıca CK1 (Kazein Kinaz 1) dahil olmak üzere belirli bir grup tarafından susturulur. Fosforilasyon aktivasyonu ve ubiquitinasyon için β -katenin'i hedeflemek üzere GSK-3 tarafından başlatılır. WNT ligandına Frizzled gibi reseptörlerin bağlanmasıyla, Disheveled ve düşük yoğunluklu reseptör ilişkili proteinler 5/6' dan dolayı degradasyon inaktive edilir. Yani, kanser kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesi ve farklılaşmasında, normal doku gelişiminde ve özellikle korunmasında dikkate değer sorumluluklara sahip WNT ile ilgili genlerin transkripsiyonu indüklenir⁴⁹. WNT / β -katenin yolu, embriyonik gelişim ve hücre göçü, hematopoez, yara onarımı dahil olmak üzere yetişkin doku homeostazında çok önemlidir. Bu nedenle bu sinyal yolunun herhangi bir deregülasyonu, kanser dahil çok çeşitli patolojilere neden olabilir⁵⁰. Normal dokuya kıyasla, çeşitli kanser türlerinde bildirilen artmış β -katenin ekspresyonu, onkogeneze bu sinyal yolunu işaret etmiştir. WNT sinyalinin hiperaktivasyonu, WNT sinyal yolu ile bağlantılı daha agresif davranış ve daha kötü

prognoz, hücre göçü, invazyon ve çoğalmayı teşvik eder. Dahası, genetik stabiliteyi korumasının yanısıra hücre kaderi, farklılaşması, hücre proliferasyonu, hücre hareketliliği, apoptoz ve kök hücre devamlılığı için önemlidir⁴⁸. Her ne kadar, kanser kök hücrelerinin oluşumu ve sürdürülmesinde WNT / β -katenin sinyal yolağının önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte, bu sinyal yolağı çevre koşullarına göre, PI3K/mTOR ile birlikte farklılaşma veya mevcudun korunması şeklinde değişkenlik gösterir⁵¹.

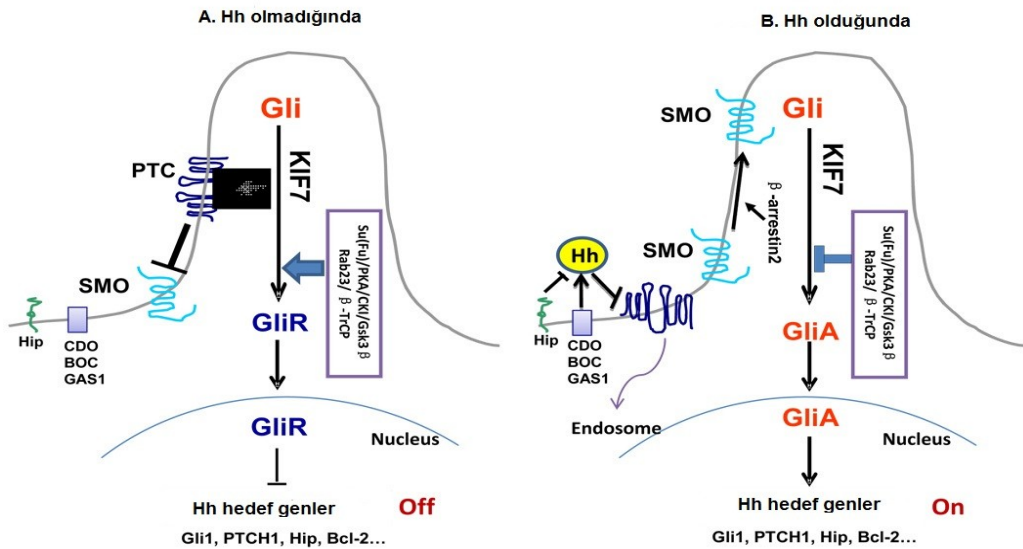
2.5. Notch Sinyal Yolağı

Oldukça korunmuş bir düzenleyici sinyalleşme ağı olan Notch sinyal yolağı, çok sayıda organ ve dokunun doğru gelişimi ve büyümesi için çok önemlidir. Notch reseptörü boyunca komşu hücreler arasındaki sinyal alışverişi artar. Notch sinyal yolağı notch ligandı bağlandıktan sonra çoklu enzim kompleksleri tarafından 3 ardışık proteolitik ayrılmaya maruz kalarak aktive olur. Proteolitik ayrılma sonucu aktif hale gelen NICD (Notch İntraselüler Domain) nükleusa girer CSL'ye (CBF-1/RBP-jk, Su(H), Lag-1) bağlanır, diğer ko-aktivatör kompleksleri ile birlikte Akt, siklinD, c-myc, COX2 (cyclooxygenaz-2), ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz), MMP-9 (matriks metalloproteinaz-9), mTOR (memeli rapamycin hedefi), NF-kB, p21,p27,p53 ve VEGF (vaskular endotelial büyüme faktörü) gibi hedef genlerin transkripsiyonlarında rol oynar⁴⁶. Notch sinyali, kanser metastazına katkıda bulundukları deneysel olarak gösterilen kanser hücrelerinde en aktif yollardan biridir. Notch yolağı ile anjiyogenez ve KKH'lerin kendini yenilemesi arasındaki bağlantılarda kritik rolü nedeniyle KKH'leri hedefleyen yeni tedavi stratejilerinde ilgi odağıdır⁵².

2.6. Hedgehog Sinyal Yolağı

Hedgehog (HH) sinyal yolağının anormal aktivasyonu, kendini yenileme, hayatta kalma, anjiyogenez, göç ve invazyon dahil olmak üzere kanser kök hücrelerinin anormal regülasyonu yoluyla birçok insan kanserinin başlaması ve ilerlemesi ile yakından bağlantılıdır. Sonic Hedgehog (Shh) sinyal yolağı, erken embriyonik dönemdeki hücrelerin büyümesi ve düzenlenmesi gibi gelişimsel süreç sırasında kilit olayları düzenleyen en önemli ağlardan biridir. Hedgehog (Hh) yolağının

anlaşılmasındaki başlıca önemli ilerlemeler, Hh geninin 1980'de Nobel ödüllü Eric Wieschaus ve Christiane Nüsslein-Volhard tarafından *Drosophila* segmentasyonunun genetik analizler ile tanımlanmasıyla elde edilmiştir⁵³. Sonic Hh yolağı 3 hedgehog ligandından; yani, Sonic Hh (Shh), India Hh (Ihh), and Desert Hh (Dhh); membran bağımlı reseptör kompleksi olan patched reseptörü (PTCH) ve smoothened reseptörü (SMO), çinko parmak proteinlerinin Kruppel ailesinin üç üyesi, yani glioma ile ilişkili onkojen homologları (Gli1, Gli2, Gli3) ve hedeflenen Hh proteinlerinden oluşur. Tümör hücrelerinden veya stroma hücrelerinden salınan glikoproteinler olan Hh ligandları, Hh (7q36.3) genleri tarafından kodlanır. Ptch'e bağlanan ligandlar yoksa Smo, Ptch tarafından bastırılır. Bununla birlikte, ligandlar Ptch'e bağlandığında ise, Smo salınarak aktive olur ve daha sonra protein kinaz A, kazein kinaz 1 ve glikojen sentaz kinaz-3β'yi aktive ederek Gli – SuFu kompleksinin fosforilasyonuna ve ayrılmasına neden olan birincil silyum içine hareket eder⁵⁴. Serbest bırakılan tam uzunluktaki Gli, çekirdeğe doğru yer değiştirir ve GLI1, PTCH1, siklinler D&E ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler gibi bir dizi hedef proteini etkiler. Üç tür Gli vardır: Gli1, Gli2 ve Gli3. Gli1 promotör, Gli3 çoğu durumda bir baskılayıcıdır ve Gli2, Gli1 ifadesini etkileyen iki yönlü bir düzenleyici olarak hizmet eder. Bu yolun inhibisyonu, KKH'leri tamamen ortadan kaldırarak kanseri iyileştirmek için terapötik stratejiye katkıda bulunabilir.



Şekil 2. Memeli hücrelerinde hedgehog sinyal yolağı için basitleştirilmiş model⁵⁵

2.6.1. PTCH 1 (Patched 1)

Hh / SHH reseptörü, iki büyük ekstraselüler loop ve iki büyük hücre intraselüler loop'a sahip 12 geçişli bir transmembran proteindir. İki memeli PTCH (9q22) Patched1 (PTCH1) ve Patched2 (PTCH2) olmak üzere 2 homologue tanımlanmıştır. Üç Hh ligandına eşit afinite ile bağladıkları ve SMO proteininin aktivitesini inhibe ettikleri gösterilmiştir. İnsan Ptch1 geni kromozom 9q22.3 üzerinde bulunur; 23 ekson içerir ve 1447 amino asitlik bir glikoproteini kodlar. Ptch1 öncelikle SHh proteinleri üreten mezenkimal hücrelerde ifade edilirken, Ptch2 deri ve testis epitel hücrelerinde ifade edilir. Ptch ve Hh proteinleri hücre döngüsünü iki şekilde düzenler. İlk olarak, Hh ligandı olmayan Ptch, siklin B1 ve sikline bağımlı kinaz 1'den (CDK1) oluşan olgunlaşma teşvik faktörünü (MPF) bağlar. MPF'yi sitoplazmada bağlamak veya tutmak, aktivitesini engeller. Hh, Ptch'e bağlandığında, siklin B1 salınır ve hücre döngüsü devam eder. İkinci olarak, Hh sinyal iletim yolağı, aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesini teşvik eden siklin D ve siklin E'nin transkripsiyonuna yol açar⁵⁶.

2.6.2. SMO (Smoothed)

SMO (7q32), Frizzled (FzD) sınıfının G-protein-bağı reseptörlerin (GPCR'ler) bir üyesi olan ve Hh sinyal yolağının pozitif bir düzenleyicisi olarak işlev gören yedi geçişli bir integral membran proteindir. SMO, küçük moleküllu modülatörlere bağlanan ve bu nedenle Hh sinyal yolundaki SMO işlevi için vazgeçilmez olan, ekstraselüler sisteinden zengin bir alana (CRD) sahiptir⁵⁷. Hh ligandının bağlanması ve Ptch1 proteininin degradasyonundan sonra Smo, PKA ve CK1 tarafından fosforile edilerek endositozu ve degradasyonu bloke edilir. Smo, Gli proteini nihai hedef olduğu, bir fosforilasyon kaskadında sitoplazmaya sinyal iletir⁵⁸.

2.6.3. GLI (Glioma- associated Oncogene 1)

Glioblastoma multiforme (GBM), yetişkinlerde en yaygın ve kötü huylu birincil beyin tümörüdür. İnsan Gli (12q13) geni, kromozom 12'de (q13 ila q14.3) bulunur ve glioblastoma multiforme (GBM) 50 kattan fazla gen amplifikasyonu nedeniyle 1987'de Vogelstein tarafından tanımlanmıştır. Gli proteinleri, hedef genlerin promotorlarına

doğrudan bağlanarak onların ifadesini düzenler⁵⁹. Gli1'in, G1 hücre döngüsü ilerlemesi, tümör oluşumu ve ilerlemesi gibi farklı hücresel süreçlerde yer alan hedef genlerin promoter bölgesine bağlanarak omurgalılarda SHH sinyalinin bir aracısı olduğu gösterilmiştir Hh sinyallerinin ötesinde, Gli1 aktivitesi ayrıca Ras, Myc, Akt, p53 ve PTEN dahil olmak üzere çeşitli öğeler tarafından düzenlenir⁶⁰.

2.7. Kanser de Hedgehog Sinyal Yolağının Rolü

Hh sinyal yolunun fonksiyon bozukluğu veya anormal aktivasyonu, Gorlin sendromu olarak da bilinen bazal hücre Smo, sendromu (BCNS), sporadik bazal hücre karsinomu (BCC), medulloblastomlar (MB'ler), rabdomyosarkomlar, menenjiyomlar gibi kanserler ile ilişkilidir. Hh yolundaki bileşenlerin deregülasyonu ile malignite arasındaki doğrusal ilişki nedeniyle tümör gelişimine katkı yapan 3 sinyal yolağından biri haline dönüştürmüştür⁶¹. Farklı kanser türlerinde anormal Hh sinyal aktivasyonu için önerilen üç mekanizma bulunmaktadır.

2.7.1. Tip I - ligand bağımsız sinyalleşme

Tip I'de Hh sinyalleşmesinin ligand bağımsız aktivasyonu, ligand yokluğunda Hh sinyalleşmesinin yapısal aktivasyonuna yol açan ya Smo'daki aktive edici ya da Ptch1 ve Sufu'daki (Hh sinyal negatif düzenleyiciler) inaktive edici mutasyonlardan kaynaklanır. Bu genlerin somatik mutasyonları, sporadik BCC'lerde ve MB'lerde de bulunmuştur. Sporadik BBC, insanlarda en yaygın kanserdir ve hemen hemen tüm vakalar, Hh sinyal yolunun yapısal aktivasyonuna yol açan bir gen mutasyonundan kaynaklanır⁶².

2.7.2. Tip II – ligand bağlı otokrin / jukstakrin sinyalleşme

Hh sinyalleşmesi ayrıca ligand bağlı otokrin / jukstakrin ile aktive edilebilir. Hh yolu, hücre-özerk bir şekilde aktive edildiğinden, Hh ligandı aynı veya onu çevreleyen tümör hücreleri tarafından üretilir ve alınır. Liganda bağımlı otokrin / jukstakrin Hh sinyal yolunun aşırı ekspresyonu mide, özofagus, pankreas, kolorektal⁶³, yumurtalık ve endometriyal⁶⁴, meme⁶⁵, prostat⁶⁶, akciğer⁶⁷, melanomlar⁶⁸, gliomalar⁶⁹ ve diğer

ekstrakütanöz tümörler dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde bulunmuştur. Hh ligandının aşırı ekspresyonuna ek olarak, diğer tümörler yüksek seviyede PTCH1 ve GLI ekspresyonu sergiler.

2.7.3. Tip III - ligand bağımlı parakrin sinyalleşme

Tip III sinyalleşme, ligand bağımlıdır ve parakrin sinyali kullanır. Parakrin Hh sinyali normal embriyonik gelişim sırasında önemli bir rol oynamasına ve birçok dokunun büyümesi ve sürdürülmesi için gerekli olmasına rağmen, stromal hücrelerdeki Hh yolağının parakrin aktivasyonu, prostat, pankreas ve kolon gibi çeşitli kanserlerle de ilişkilendirilmiştir. Yani, tümör hücreleri tarafından salgılanan Hh ligandları, tümör stromal hücreler üzerindeki Ptch1 reseptörlerine bağlanır ve daha sonra Hh yolağının aktivasyonunu sağlar. Bir geri bildirim döngüsünde, stromal hücreler (vasküler endotelial büyüme faktörü [VEGF], insülin benzeri büyüme faktörü [IGF], Wnt, PDGF ve BMP) gibi parakrin büyüme sinyalleri salgılayarak tümör hücrelerinin proliferasyonlarını ve farklılaşmalarını destekler ve teşvik eder⁷⁰.

Bunun yanı sıra yalnızca B hücreli lenfomalar, multiple miyelomlar ve lösemiler gibi hematolojik malignitelerde bulunan "Ters" parakrin sinyal modeli de tanımlanmıştır. Bu modelde tümörler, doğrudan kemik iliği veya lenf düğümü stromal hücrelerinden salgılanan Hh ligandını alır. Dolayısıyla, ters parakrin ligandına bağımlı kanserlerde stromal hücreler, tümör büyümesi için elverişli bir mikro ortam sağlar.⁷¹

2.8. Kanser Kök Hücrelerinde Hedgehog Sinyal Yolağı

Shh yolu kanser kök hücrelerinin (KKH) düzenlenmesi ve köklülüklerinin sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bu özelliği nedeniyle aynı yolağı kullanan (Shh) normal kök hücrelerle benzerlik gösterir. Kronik miyeloid lösemi ve meme kanserinde yapılan çalışmalar, Shh sinyalinin kanser kök hücrelerinin korunması için gerekli olduğunu ve Shh yolağının inhibisyonunun, kök hücre çoğalmasının ve yenilenmesinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Son çalışmalar, solid tümörlerde KKH'lerde Shh sinyalinin metastatik ilerleme ile ilişkili olduğunu, pankreas ve kolorektal kanserlerde KKH'lerin epitel-mezenkimal geçişi tetiklediği gösterilmiştir⁷².

2.9. Melanoma

Malign melanom, cilt kanseri ile ilişkili ölümlerin birçoğundan sorumlu olan oldukça metastatik bir kanser türüdür. İnsan solid tümörlerinde kanser kök hücrelerinin (KKH) keşfedilmesi ile, normal melanositlerin biyolojisi ve neoplastik dönüşümü hakkında açıklanamayan bazı olayların daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur.

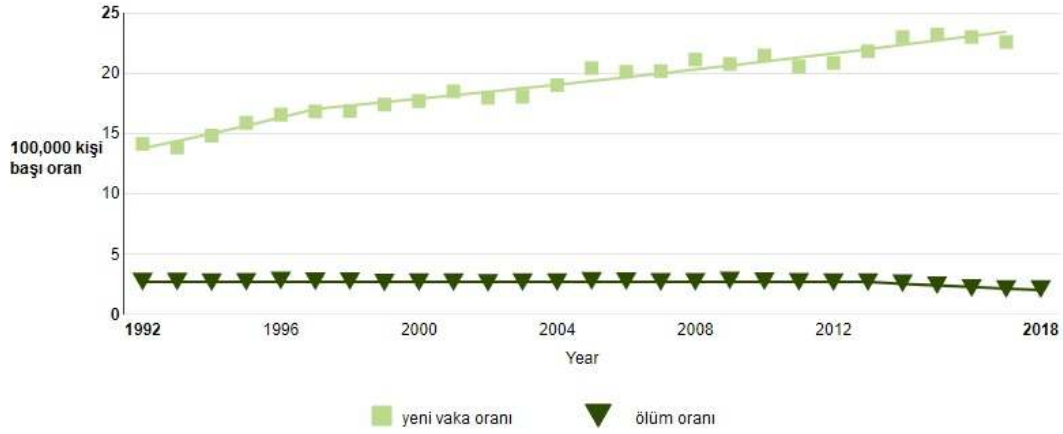
Çoğu metastatik karaktere sahip melanoma hastaları, mevcut tedaviye istenen cevabı verememekte olup daha etkili tedavilerin geliştirilmesi için yeni yaklaşımlara olan ihtiyacı gündeme getirmiştir.

Bazı kanser türlerinin kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması, tümör dokusunda sadece uygulanan tedavi stratejisinin seçim baskısıyla ortaya çıkan klonal hücre seçilimi ile açıklanamayacağını aynı zamanda KKH'lerinin de ilaç direncinde alternatif bir mekanizma olarak göz önünde bulundurulması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Kanser kök hücreleri, normal kök hücrelerle sinyal yolları da dahil olmak üzere (Wnt, Notch ve hedgehog) bazı önemli özellikleri paylaşmaktadır.

2.9.1. Melanoma Kanseri Epidemiyolojisi

Metastatik melanom, ölüm oranı oldukça yüksek bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1950-2007 yılları arasındaki melanoma insidansı erkeklerde 17 kat (1,9/100.000'den 33,5/100.000'e), kadınlarda 9 kat (2,6/100.000'den 25,3/100.000'e) artmıştır. 2013-2017 yılları arasında yeni melanoma vakaları yılda erkek ve kadınlarda 22,7/100.000'dir. 2014-2018 yılları arasındaki kadın ve erkeklerde ki ölüm oranları ise 2,3/100.000'dir. 2017'de Amerika Birleşik Devletleri'nde melanom ile yaşayan 1.245.276 kişi bulunduğu tahmin edilmektedir.

2020 yılındaki tahmini vaka sayısı 100,350 ve bu oran tüm kanser vakalarının %5,6 sını kapsarken, tahmini ölüm sayısı 6,850 ve tüm kanser ölümlerinin ise %1,1' ini kapsamaktadır⁷³.



Şekil 3. U.S'deki ölüm oranları⁷³

Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde melanom görülme sıklığı erkeklerde 1,7/100,000 ve kadınlarda 1,2/100,000 olarak bildirilmiştir⁷⁴.

Melanom, tüm cilt kanserlerinin % 10'undan azını oluştururken, cilt kanserine bağlı ölümlerin % 75'inden fazlasından sorumludur⁷³.

2.9.2. Melanoma kanseri patalojisi ve moleküler mekanizması

Melanositler, cildin üst katmanında bulunan deri hücreleridir. Ortalama bir insanın cildinde yaklaşık 3 milyar kutanöz melanosite karşılık gelen, insan epidermisinin milimetrekaresi başına yaklaşık 1500 melanosit vardır. Melanositler, bazal epidermis içinde bir azınlık hücre popülasyonunu temsil eder ve seyrek olarak bölünürler (yılda iki defadan az)⁷⁵. Ana işlevleri, komşu keratinositlerine melanin pigmenti sağlamaktır. Çoğalmaları ve pigment üretimi, daha sonra p53'e bağlı bir şekilde α -melanosit uyarıcı hormon (α MSH) salgılayan keratinositlere UV radyasyonunun neden olduğu DNA hasarı ile uyarılır⁷⁶. α MSH, melanositler üzerinde ifade edilen ve melanositlerin keratinositlere ilettiği melanin sentezini indükleyen melanokortin 1 reseptörüne (MC1R) bağlanır. Melanin, UV radyasyonunu dağıtan ve absorbe eden kompleks bir makromoleküldür ve epidermal keratinositler, çekirdeklerini UV radyasyonunun neden olduğu DNA hasarından korumak için kullanır. Epidermal melanositler, UV kaynaklı DNA hasarına karşı savunma sisteminin bir parçasıdır. Melanom, UV radyasyonu nedeniyle yanma veya bronzlaşmadan kaynaklanan DNA hasarı, melanositlerdeki

değişiklikleri (mutasyonları) tetiklediğinde ve kontrolsüz hücre büyümesine neden olduğunda oluşur⁷⁷.

Melanosit hücrelerinden köken alan melanomalar, hücresel olduğu kadar moleküler düzeyde de farklılaşmakta ve bu durum terapi yaklaşımlarını etkilemektedir. Primer kutanöz melanom ameliyatla tedavi olasılığı bulunmasına rağmen, ilerlemiş metastatik melanom tek başına ameliyatla tedavi edilemez ve bu nedenle daha iyi terapötik yaklaşım gerektirir. Melanom hastalarının terapötik yönetiminde karşılaşılan aşırı zorluklar, daha etkili tedavi seçenekleri bulma umuduyla malign melanomun moleküler patogenezi aydınlatmak için büyük ölçekli çabalara yol açmıştır. Melanom hücrelerinin diğerlerine göre büyüme ve hayatta kalma avantajına sahip olmasına izin veren spesifik moleküler değişikliklerin belirlenmesi, melanoma hastalarının prognozunu iyileştirebilecek daha etkili hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine izin verebilir.

Melanom ailelerinde iki gen keşfedilmiştir: 9p21 kromozomunda CDKN2A (p16) ve kromozom 12'de CDK4. Bir tümör baskılayıcı gen olan CDKN2A hücre döngüsü regülasyonunda ve yaşlanmada çok önemli bir rol oynar. CDKN2A genindeki mutasyonlar, ailesel melanoma duyarlılık sağlar. Sporadik melanomlarda kısmen veya tamamen p16 ekspresyonu kaybı da tanımlanmıştır. MC1R (Melanokortin 1 Reseptörü) ve DNA onarım genleri gibi diğer genler, genel popülasyonda melanoma duyarlılığının belirlenmesinde daha önemli olması muhtemeldir⁷⁸.

B-Raf Çalışmaları, tüm melanom vakalarının yaklaşık% 40-60'ının aktive B-Raf mutasyonu sergilediğini göstermiştir. B-Raf, hücre büyümesini ve proliferasyonunu destekleyen RAS-RAF-MEK-ERK kinaz yolunun bir parçası olarak bir serin / treonin protein kinazı kodlayan bir proto-onkojendir. Normalde B-Raf, büyüme sinyallerine yanıt olarak başka bir RAF kinaz ile homo- veya heterodimerizasyona katılır. Bununla birlikte, aktive edici bir mutasyon, B-Raf'ın kendi kendine yeterli ve sürekli olarak aktive olan bir monomer olarak hareket etmesine yol açar. Sonuç olarak, kontrolsüz hücre çoğalması, tümör gelişimi ve büyümesinde rol oynayabilir⁷⁹.

2.10. Metastatik Melanoma

2.10.1. Melanom metastazlarının oluşumu

Melanomlar, hücreleri birincil tümörün lokal bölgesinin ötesine yayıldığında ve diğer dokuları kolonize ettiğinde metastatik olarak adlandırılır. Birçok solid tümöre benzer şekilde, melanom metastazları genellikle ilk olarak birincil tümörün boşaltma alanındaki lenf düğümlerinde ortaya çıkarken, iç organları içeren uzak metastazlar daha sonra ortaya çıkma eğilimindedir. Bu kavram, metastatik yayılmanın seri olarak primer tümörden bölgesel metastaza ve nihayet uzak metastazlara doğru ilerlediği varsayımına yol açmıştır⁸⁰. Metastaz sırasında, tümör hücreleri ALCAM, VE-cadherin, L1-CAM, integrin $\beta 3$, ICAM-1, E-cadherin ve N-cadherin gibi bazı adezyon moleküllerini kaybeder veya kazanır. Malign melanom, hayatta kalma süresi 5 yıldan az olan oldukça metastatik bir hastalıktır. Çoğunlukla akciğerlere metastaz yapar ve ayrıca diğer iç organları da etkiler. Çeşitli klinik raporlar, bölgesel lenf nodu metastazının melanomlu hastalar için sonucun bir belirleyicisi olduğunu ileri sürmektedir. Bölgesel lenf nodu metastazının varlığı, yaygın olarak sistemik ve adjuvan tedavinin bir göstergesi olarak kullanılır. Bununla birlikte, potansiyel nüks etmesinin riski, tümörlerin heterojen doğası nedeniyle her bireyde büyük ölçüde değişir. Al Dhayb ark. ve Rappa ark. malign melanom gelişiminde CD133⁺ KKH'lerin varlığını ve lenf düğümlerinde, akciğerde ve/veya diğer iç organlarda metastaz yapma potansiyellerini göstermişlerdir. Bu hücreler, KKH'lerin kemodirenç yeteneği ile ilişkilendirilebilen düşük düzeyde proliferatif yapıcı Ki-67 belirtecini eksprese etmiştir^{81,82}. Fusi ve arkadaşları CD133'ün, dolaşımdaki melanom hücrelerinde Nestin ekspresyonu ile sağkalım arasında doğru bir ilişki olduğunu gözlemlediler⁸³. İnvazyon sırasında tümör hücreleri, epigenetik modifikasyonlar aracılığıyla farklı fenotipik değişiklikler sergiler. Çalışmalar, EZH2, H3K4me2 ve H3K27me3'ün birlikte ifadelerinin potansiyel KKH özellikleriyle ilişkili olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, tümörün invazif bölgesinde EZH2, H3K4me2 ve H3K27me3 ekspresyonları önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, bu moleküllerin ekspresyonları, birincil melanom vakaları olan hastalara kıyasla metastatik bölgelerde daha az olduğu gösterilmiştir⁸⁴. Tüm bu sonuçlar, KKH'lerin metastatik lezyon oluşumunda ve tümör rekürrensinde rol oynadığını göstermektedir.

2.11. Melanoma Kök Hücresi

Melanom, melanositlerden kaynaklanan heterojen bir cilt kanseridir ve ileri aşamalarında kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviye direnç oluşturmaya başlar. Bu heterojenliği açıklayan bir teori, kanser kök hücre hipotezidir. Kanser kök hücreleri kendi kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleriyle tanımlandığından, melanom kök hücreleri (MSC'ler) ayrıca malign melanom başlatan hücreler olarak da adlandırılır. İlk kez melanom kök hücrelerinin varlığı 2005 yılında Fang ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu MSC'ler, normalde olgun B lenfositlerinin bir belirteci olan CD20 yüzey belirteci açısından zengin olması, bir köklülük belirteci olarak melanom hücrelerinin kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır⁸⁵. Nitekim bazı çalışmalar da, kemo dirençli melanom hücrelerinin veya klinik örneklerin, CD133 ve ABCG2 dahil olmak üzere bir dizi kök hücre belirtecini aşırı ifade ettiğini göstermiştir⁵. 2008'de Schatton ve arkadaşları tarafından melanom kök hücreleri için kabul edilen ilk fonksiyonel biyobelirteç olarak ilaç direnci sağladığı bilinen bir ABC taşıyıcı proteini olan ABCB5'i gösterildi⁴⁴. Bundan sonra MSC'ler için CD133, CD271 ve ALDH dahil birçok başka belirteçler de keşfedildi^{8,86,87}. Oysa, daha önceki çalışmalar, melanom kök hücrelerinin CD20, CD133 ve MDR1 gibi belirteçlerin ekspresyonuna dayalı olarak karakterizasyonunu sağlamaktaydı⁴⁴. Ayrıca, Nordvig ve ark. CD133⁺ keratinositlerin, melanom dışı deri kanserinde klinik etkileri olabilen yüksek mitokondriyal potansiyel sergilediğini bildirmiştir⁸⁸. Daha yakın zamanlarda, Kumar ve ark. CD133⁺ melanoma spesifik KKH'lerin in vivo koşullar altında uzun vadeli tümörijenik potansiyeli koruduğunu göstermişlerdir⁹.

CD133 birçok kanserde yaygın bir şekilde kanser kök hücre belirteci olarak kullanılan prominin 1 (prom1) olarakta bilinen bir pentaspan transmembran glikoproteinidir. CD133, beyin, yumurtalık, karaciğer, prostat, pankreas ve kolon dahil kanserlerden izole edilen kanser kök hücrelerinde ve melanomlarda ifade edilir. CD133 (+) ve diğer kanser kök hücrelerinin nüksetme ve azalmış hayatta kalma konusunda kritik bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Ve melanomun fare modellerinde başarı ile bir anti-kanser bileşeni olarak ilgi çekmiştir⁸⁷.

Kutanöz melanom, PI3K / Akt / mTOR, p16 / CDK4Rb, Wnt ve / veya p53'teki değişikliklerle birlikte MAPK yolağındaki sürücü mutasyonlarıyla ilişkilidir. B-Raf-mutant melanom, kombinasyon halinde mutant B-Raf ve MEK inhibitörleri kullanılarak

hedeflenen terapi ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir. MEK inhibisyonu, in vitro ve in vivo olarak N-Ras mutasyona uğramış melanomlar için de etkili olabilir⁸⁹.

Bu bulgulara dayanarak, melanomların heterojenliğe ve tümörjenezde katkıda bulunan bir kök hücre alt popülasyonunu içerebileceğinden yola çıkarak, kök hücre popülasyonunun hedeflenmesi melanomlar için etkili tedavilerin önünü açabilme kapasitesi taşır.

2.12. Melanoma kanseri ve Hedgehog Sinyal Yolağı

Cilt kanseri, dünya genelinde sık görülen bir kanser türü olup görülme sıklığı heryıl artmaktadır. Shh sinyalinin cilt (deri) gelişiminin çeşitli aşamalarında belirli temel süreçleri düzenlemesinin yanı sıra epitelyal-mezenkimal etkileşimi de düzenler. Memeli epidermisi, epidermal kök hücreler olarak bilinen bir keratinosit alt popülasyonunun sürekli çoğalmasıyla korunur.

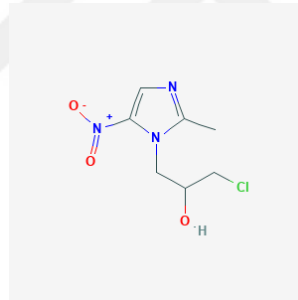
Hh sinyalinin insan kanserlerindeki rolüne dair görüşlerin çoğu BCC (basal hücreli karsinoma) üzerindeki çalışmalardan gelmiş olmakla birlikte, son kanıtlar, Hh yolağının aktivasyonu ile oluşan melanom ile SCC (sküamoz hücre karsinoma) dahil olmak üzere diğer insan cilt kanseri türlerinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Hh sinyal iletimi, invazif davranışın kazanılmasına katkıda bulunarak melanomun ilerlemesinde de rol oynar. Yüksek Gli2 ekspresyonuna sahip melanom hücreleri, düşük Gli2 ekspresyonuna sahip hücrelere göre kemik kaybı ve kemiğe metastaz yapma ile bağlantılı invazif ve metastatik bir fenotip ile karakterize edilir. Gli2, promotörüne doğrudan bağlanarak MITF-M'yi (Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü tip M) baskılar ve melanositik farklılaşma markörlerinin kaybına katkıda bulunur⁹⁰. Gli1 doğrudan osteopontini indükler ve bunların yüksek ekspresyon seviyeleri, insan melanomunda tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilidir⁹¹. Benzer şekilde, uveal melanom hücre hatlarında Hh sinyalleşmesinin inhibisyonu, hücre canlılığını, epitelyal-mezenkimal geçişi ve anjiyogenezi azalttığı gösterilmiştir⁹².

Shh sinyal yolu, ciltteki kök hücre popülasyonunu düzenleyen önemli bir yoldur. Shh yolu ile bağlantılı bu özellik, cilt kanseri dahil olmak üzere çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi için yeni terapötiklerin geliştirilmesi lehine kullanılabilecek potansiye sahiptir. Bu yolağın anormal aktivasyonu, artmış proliferasyon ve ardından

deri ve diğer dokularda neoplazi gelişimi ile ilişkili olduğundan, yolağa spesifik güçlü inhibitörlerin geliştirilmesi, Shh yolağına bağlı neoplazmalar için başarılı terapötik müdahale sağlamada yardımcı olabilir.

2.13. Ornidazole

Ornidazole, ameoba ve trichomonas enfeksiyonlarında kullanılan bir nitroimidazol antiprotozoal ajandır⁹³. Bu nedenle, bağırsak amebiazı, amibik karaciğer apseleri, anaerobik enfeksiyonlar, Crohn hastalığı, duodenal ülserler, giardiasis, cerrahi profilaksi, trichominyasis ve vajinitis gibi çeşitli klinik durumların tedavisinde kullanılır¹³. Protozoal ve anaerobların hücrelerine pasif difüzyon ile girer ve hücre DNA'sına bağlanır, DNA sarmalının destabilizasyonu ve DNA sentezini inhibe ettiği gözlemlenmiştir⁹⁴.



Şekil 4. Ornidazole'un kimyasal yapısı

Yeni bir ilaç geliştirmek milyar dolarlara mal olabileceği bir zamanda, mevcut ilaçların yeniden kullanımı fikri oldukça cazip olmakla birlikte Hh sinyal yolağı birçok kanser çeşidinde aktive edilir ve bu nedenle yeni anti kanser ajanlar için ilgi çekici bir hedef oluşturmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda verilmiş olup, araştırma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında yapılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Swiss albino fareler Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, 26.02.2018 tarihli kararla etik kurul belgesi alındı.

Kimyasal Malzemeler

- Trypan Blue (VWR Life Science)
- Besi Yeri (DMEM- Gibco)
- DPBS (Gibco)
- Trypsin (Gibco)
- MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) - (VWR Life Science)
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) -Fisher Bioreagents
- 1M Tris- HCl pH8 (Tris Hydrochloride 1M Solution- Fisher Bioreagents)
- ddH₂O (AMBION)
- Kristal viyole (Fisher Scientific)
- Metanol (Fisher Scientific)
- Sodyum Klorit (Fisher Chemical)
- Triton X-100 (Fisher)
- Tris Hydrochloride (Fisher)
- BSA (Sigma)
- Trizol (Thermo Fisher Scientific)
- Kloroform (Fisher)
- İzopropanol (Fisher)
- PE Anti-CD133 antibody (Biolegend)

3.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Steril Kabin (Thermo Fisher Scientific)

- CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific HERAcell v10s 160i)
- İnvert Mikroskop (leica)
- Santrifüj (Eppendorf)
- -20 (Fisher Scientific)
- -80 (Thermo Scientific)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Plate okuyucu (biochrom)
- Thermal Cycler (BioRad)
- Real Time PCR cihazı (Applied Biosystem)
- Vortex (VWR)
- Flow stometri (BD FACSAria III)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Melanoma Hücre Hatlarının Hazırlanması

Çalışmamızda hızlı gelişen ve metastatik bir tip olan B16F10 melanoma hücre hattı kullanıldı. B16F10 melanoma hücre hattının T75 flask içerisindeki DMEM besiyeri üzerine ekimi yapıldı. Bu hücre hattı, %10 fetal sığır serumu, 20 mM glutamin, penisilin ve streptomisin ilave edilmiş Dulbecco modifiye edilmiş Eagle mediumunda (DMEM) 37 °C, %5 CO₂, nemlendirilmiş atmosferde kültüre edildi.

3.3.2. Hücre Canlılık Testi: Kristal Viyole Boyama

- 12 kuyusu olan plakalara 3'lü tekrar olacak şekilde uygun miktarda hücre ekildi.
- 12 kuyulu plakalara 70000 hücre ekildi.
- Plakalar 1 gün süre ile 37 °C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat sonra Ornidazole uygulaması yapıldı ve 37 °C , %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler (48 saat sonra) iki kere PBS ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 300- 500 µl kristal viyole eklendi. Plakalar 30 dakika oda koşullarında inkübe edildi.

- Kristal viyole solüsyonunun hazırlanışı:
- 0.5g kristal viyole tozu (Fisher Scientific)
- 80ml distile H₂O
- 20ml metanol (Fisher Scientific)
- Kristal viyole distile suda çözünür üzerine metanol eklendi. Boya karanlıkta oda sıcaklığında 2 ay saklanır.
- Boyayı ortamdan uzaklaştırmak için iki kere PBS veya distile su ile yıkama yapıldı. Plakalar kurumaya bırakıldı.
- Verilerin değerlendirilmesi: Plakalar kuruduktan sonra fotoğrafları çekildi. Elde edilen fotoğraflardan Adobe İllustrator CS4 Programı ile hücre yoğunluğu hesaplandı.

3.3.3. Hücre Canlılık Testi: MTT

- Hücre sayım cihazı ile hücre sayımı yapıldı yapıldı.
- 10000 hücre uygulanacak her doz için 3'lü tekrarı olacak şekilde 96 kuyulu plakalar'a ekildi.
- Plakalar 37°C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde 1 gün süre ile büyümeye bırakıldı.
- 24 saatlik inkübasyondan sonra ilaç uygulaması yapıldı ve kullanılan ilaca bağlı olarak plakalar 1-3 gün boyunca inkübatörde bekletildi.
- Belirlenen bekleme süresi tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 10 µl Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) eklendi.
- MTT boyası 5g/ml olacak şekilde PBS'te hazırlandı ve filtreden geçirildi.
- Boya eklendikten sonra 96 kuyucuklu plakalar 37 °C' de %5 CO₂ ortamında 4 saat inkübe edildi.
- Çözünürleştirme solüsyonu: 10 ml %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 200 µl 1M Tris- HCl pH8 (Tris Hydrochloride 1M Solution), 9.8 ml ddH₂O olacak şekilde hazırlandı.
- 4 saatlik bekleme süresinin sonunda boyanın üzerine 100 µl çözünürleştirme solüsyonu eklenidi.

- Yaklaşık 12 saatlik inkübasyondan sonra plate okuyucuda 590 nm’de absorbans değeri ölçüldü.
- Verilerin değerlendirilmesi:

Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$100 \times (\text{örnek absorbans değeri} - \text{blank absorbans değeri} / \text{kontrol absorbans değeri} - \text{blank absorbans değeri})$

Örnek: hücre+besi yeri+ ilaç uygulaması+ MTT+ çözünürleştirme solüsyonu

Kontrol: hücre+besi yeri+ MTT+ çözünürleştirme solüsyonu

Blank: besi yeri MTT ve çözünürleştirme solüsyonu içeren grup

3.3.4. Hücre Göçü Testi: Yara açma deneyi (wound-healing assay)

- 6 kuyusu olan plakalara 3’lü tekrar olacak şekilde uygun miktarda hücre ekildi.
- 6 kuyulu plakalara 80000 hücre ekildi.
- Plakalar 1-2 gün süre ile 37°C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra %0.05 FBS’li besiyerinde 37°C , %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- Ardından steril 200 µl pipet ucu ile vertikal olacak şekilde boydan boya yara açıldı. Ardından %0.05 FBS’li besiyerinde ilaç uygulaması yapıldı ve mikroskop altında 0. Saat olarak fotoğraflandı.
- 8. ve 24. saat sonra hücre göçünü fotograflamak için inverted mikroskop kullanıldı.
- Yara alanını hesaplamak için İmaj J programı kullanıldı.

3.3.5. DNA hasarının belirlenmesi tek hücre jel elektroforezi- Comet Deneyi

- Tripsinize edilen hücreler ependorfa aktarıldı. 1000 rpm’de 5 dk santrifüj ettikten sonra pellet atıldı ve üzerine 50 µl PBS konuldu.

- Ardından 100 µl hücre-100 µl LMA ile karıştırılarak içerisinde 100 µl çekildi ve 1 gün öncesinden NMA ile kaplanan lamalar üzerine yayıldı.
- Lamel ile üzeri kapatılarak 15 dk + 4°C’de bekletildi.
- Daha sonra + 4°C’den çıkarılan hücrelerin üzerinden lameller çekilerek + 4°C’de 1 saat lizis solüsyonuna konuldu.
- Ardından elektroforez tankına yerleştirilen lam’ların üzerine elektroforez solüsyonu döküldü.
- Elektroforez çalıştırılmadan önce tankın üzerine 15-20 dk buz aküsü konulduktan sonra 25 V 20 dk yürütüldü.
- Elektroforezin ardından + 4°C’de 15 dk nötralizasyona konuldu.
- Nötralizasyondan alınan lamalar + 4°C’de 10 dk %96’lık etanolde bekletildi.
- Daha sonra oda sıcaklığında 10 dk boyunca kurutma kağıdının üzerinde kurumaya bırakıldı.
- Ethidium Bromide ile boyamanın ardından hücreler floresan mikroskopta değerlendirildi.

3.4. CD133 Kök Hücrelerinin İzolasyonu

3.4.1. Manyetik aktive hücre ayırma Sistemi (FACs) ile Hücrelerin Sorting edilmesi:

CD133⁺, CD133⁻ alt-grupları izole edilmek istenen CD fenotip hücreleri, B16F10 hücre hatlarından sorted edildi.

- Kültüre edilen B16F10 hücreleri tripsin ile toplanıp eppendorf tüplere transfer edildi.
- 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edildikten sonra hücreler 1 ml PBS ile yıkanıp yine 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edildi.
- PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler buz üzerinde anti-CD133-PE antikor (biolegend) içeren (1:100 dilüsyon) 300 mikrolite FACS tamponunda (PBS+10% FBS) 30 dakika bekletildi.

- Daha sonra 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edilip antikor içeren tampon uzaklastirildi ve yerine 300 mikrolitre FACS tamponu eklenip FACS Aria III ile hücre saflaştırma sisteminde analiz edilerek hücreler saflaştırılmıştır.

Ayrırma işleminden sonra CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri santrifüj edildi, yıkandı ve taze DMEM (GIBCO,USA) ortamı ile yeniden süspanse edildi. Kültür ortamı iki günde bir değiştirildi ve inverted faz kontrast mikroskobu altında 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saatte hücre proliferasyonu gözlemlendi.

3.5. Tümör Hücresi Enjeksiyonu için kanser hücrelerinin hazırlanması ve hücrelerin farelere verilmesi

- Unsorted, CD133⁺ ve CD133⁻ alt grupları kültüre edilip yeterli sayıya ulaştıktan sonra Tripsin muamele edilip hücreler toplandı.
- Enjeksiyon yapılacak olan bölge az miktarda etil alkolle silinerek hem tüylerin yapışıp derinin daha kolay görünmesi sağlandı hemde enjeksiyondan sonra farelerin bölgeleri ağızlarıyla tahriş ederek enjekte hücreleri dışarı çıkmaya zorlamaları önlemeye çalışıldı.
- Hücrelerin sayılmasının ardından 8 haftalık Swiss albino erkek farelere 5×10^5 hücre deri altlarına enjekte edildi.
- Melanoma hücre hattı enjeksiyonunun ardından fareler belirtilen koşullarda (12:12; karanlık:aydınlık, 21-22 °C, %40-60 nem) yetiştirilmeye devam edildi (6 hafta boyunca) bu sırada oluşan tümör boyutları haftada iki kere kapiler (Vernier Calipers) yardımıyla ölçüldü.
- Tümör boyutu 100 mm³'e ulaştıktan sonra, intraperitoneal olarak (i.p.) Ornidazole (Sigma, Germany) (80 mg / kg vücut ağırlığı) enjekte edildi (i.p) (12 gün boyunca) ve tümör hacimleri ölçüldü. Hem kontrol grupları hem de tedavi uygulanmış olan fareler kurban edildi.
- Tümörler çıkarıldı ve fotoğraflandı.
- Tümör hacimleri $V = \text{uzunluk} \times \text{genişlik}^2 / 2$ kullanılarak ölçüldü.
- Tümör boyutundaki değişimler ile ilgili temel istatistiksel analizler Excel (Microsoft) veya GraphPad Prism software (Graphpad) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 5. Hazırlanan melanoma hücre solüsyonu insülin enjektörüyle farelere verildi.

3.6. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

İlgilendiğimiz genlerin ekspresyon miktarları SYBR green metodu ile RT-PCR (reverse transkriptase polymerase chain reaction) yöntemiyle belirlendi. Housekeeping gen olarak β -Actin kullanıldı.

3.6.1. Trizol ile RNA İzolasyonu:

- 50-100 mg doku buz üzerinde ependorf veya petri kabında 500 μ l trizol eklenerek homojenize edildi. Ardından 1 gece boyunca -20°C 'de bekletildi.
- 1 gece bekletilen dokuların üzerine 500 μ l trizol eklenerek iyice homojenize edildi.
- Ardından buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sırada her 5 dk da bir vortekslendi.
- 14000 rpm de 10 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi.
- Süpernatant başka bir ependorfa aktarılarak üzerine 200 μ l kloroform eklendi.
- Ardından 15 sn vorteks yapılarak 10 dk buz üzerinde bekletildi.
- Süpernatantın saydam olan kısmının %70 i başka bir tüpe aktarılarak üzerine 1:1 hacimde izopropanol eklendi.
- Vorteks yapılarak 10 dk buz üzerinde bekletildi.
- Ardından 14000 rpm de 10 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi.
- Daha sonra süpernatant kısım atılarak plakalara 1mL %75 DEPC-etilalkol eklenerek pipetaj yapıldı.

- Vortekslenerek 14000 rpm de 10 dk +4 °C’de santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak, pellet 6 dk buz üzerinde oda sıcaklığında hafif nemli kalacak şekilde kurutuldu ve DEPC (dietil pirokarbonat) suda çözündürüldü.
- Ardından buz üzerinde ependorfların ağzı açık bir şekilde 15 dk bekletildirek pipetaj yapıldı.
- RNA miktarı nanodrop ile ölçüldü A260\280 değeri 2 ve 2’ye yakın çıkan RNA’lar -20°C’de saklandı.

3.6.2. RNA’dan cDNA Eldesi:

- RNA’dan cDNA (complementary DNA) elde edebilmek için Applied Biosystems High Capacity cDNA kiti kullanıldı. Reaksiyon aşağıdaki aşamalara uygun olarak buz üzerinde gerçekleştirildi.
- Kit bileşenleri buz üzerinde çözündürüldü.
- 20 µl reaksiyon için 2µg RNA kullanıldı.
- Bileşenlerin volumü her bir örnek için Çizelge 1’de belirtildiği gibi hesaplandı.

Çizelge 1. cDNA kiti bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Bileşen	Bileşen Volümü\Reaksiyon (µl)
10x RT tampon	2.0
25x dNTP (100mM)	0.8
10XRT rastgele primer	2.0
MultiScribe Revers Transkriptaz	1.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2
Her bir reaksiyon toplamı	10.0

- Her bir tüpe 10µl RNA örneği eklendi. Reaksiyonlar PCR tüplerinde hazırlandıktan sonra vortex ve kısa süreli santrifüj yapıldı.
- PCR koşulları termal cycler’a çizelge 2 de belirtildiği gibi ayarlandı.

- Örnekler uzun süreli kullanım için -20 °C’de saklandı.

Çizelge 2. Revers transkripsiyon reaksiyonunun aşamaları

	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	4.aşama
Sıcaklık	25°C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk	120 dk	5	∞

3.6.3. Real Time PCR aşaması

- SYBR green boyası kullanıldı.
- Her bir örnek için 3 reaksiyon hazırlandı.
- Bileşenlerin volümü her bir örnek için Çizelge 3’de belirtildiği gibi hesaplandı.

Çizelge 3. Real Time RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Bileşen Volümü/Reaksiyon μ l
SYBR green master mix	12.5 μ l
Reverse+Forward Primer	2.5 μ l (10 μ M forward +reverse primer karışımından)
cDNA	1 μ l (2 μ g RNA ile hazırlanan cDNA’ dan)
Nükleaz içermeyen H ₂ O	9 μ l
Her bir reaksiyon toplamı	25 μ l

- Reaksiyonlar 96 kuyucuklu plakalar’lara aktarıldı. Üzeri adheziv film ile kapatılan plaka real time pcr reaksiyonu gerçekleştirmek üzere Applied Biosystems StepOnePlus RT-PCR cihazına aktarıldı.
- RT-PCR döngüleri Çizelge 4’de belirtildiği gibi ayarlandı.

Çizelge 4. RT-PCR için kullanılan ısı döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman(dd: ss)
Hold	50	2:00
	95	10:00
Döngü (40 Döngü)	95	0:15
	60	1:00
Melting Curve	95	0:15
	60	1:00
	95	0:30
	60	0:15

3.6.4. Real Time Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

Ekspresyon düzeylerini belirlemek için Threshold Cycle (CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür. Eşik-değer döngü (Threshold Cycle = CT) değeri bize; üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. CT; sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için ΔC_t yöntemi kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi:

$$\Delta C_t = C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ referans gen}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ muamele edilen} - \Delta C_t \text{ kontrol}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

3.7. ELİSA Deneyi

3.7.1. Doku Homojenizasyonu

- -80 °C'den çıkarılan dokuların üzerine 200 µl hazırlanan homojenizasyon sıvısı eklendi. RIPA solüsyonu kullanılmadan önce 10 ml'ye 1 adet olacak şekilde proteaz inhibitör tableti eklendi. Proteinaz inhibitörü olarak complete Mini Protease inhibitör koktail tableti kullanıldı.
- Dokular sonifikasyon (3-4 sn) ile parçalandı ve 15 dakika buz üzerinde bekletildi. 10000 rpm 'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.
- Ardından pelletler atıldı ve süpernatantlar (yaklaşık 100- 130 µl) yeni bir tüpe aktarıldı ve protein örnekleri- 80°C'de saklandı.

Çizelge 5. RIPA solüsyonu bileşenleri

RIPA SOLÜSYONU

150 mM sodium chloride stok: 5M	1500 µl
1.0% Triton X-100 stok: %100	500 µl
0.5% sodium deoxycholate stok: %10	2500ml
0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) stok: %20	250 µl
50 mM Tris Cl, pH 8 stok. 1M	2500 µl
ddH ₂ O	42,750 ml
Toplam	50 ml

3.7.2. Protein Miktarının Ölçümü (Bradford Protein Assay)

Protein Miktarı Bradford Assay kullanılarak ölçüldü. Bradford Assay Protokolü aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- Çizelge 6’da görüldüğü gibi farklı standartlar oluşturuldu.

Çizelge 6. Protein ölçümü için standartların hazırlanması

Standart	Su (µl)	BSA (10mg/mL)	Son Konsantrasyon µg/mL
1	495	5µl BSA	100
2	250	250 µl standart 1	50
3	250	250 µl standart 2	25
4	250	250 µl standart 3	12,5
5	250	250 µl standart 4	6,25
6	250	250 µl standart 5	3,125
7	250	250 µl standart 6	1
8	250	-	0

- 1X stok Bio- Rad Protein Assay reaktifinden standart ile örnekleri içeren kuyulara bu boyadan 200 µl eklendi.
- Plakalar alüminyum folyo ile kaplanarak 37 °C’de 10 dakika bekletildi.
- Protein miktarını ölçmek için plate okuyucu kullanıldı. 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.
- Sonuçlar excell’de değerlendirildi.

3.7.3. Elisa Platelerin Hazırlanması ve Absorbans Ölçümü

- Kit içerisinde çıkan standartlar, standart 5 (12 ng/mL), standart 4 (6 ng/mL), standart 3 (3 ng/mL), standart 2 (1.5 ng/mL), standart 1 (0.75 ng/mL) olarak hazırlandı.
- ELİSA plate üzerindeki blank kuyucuğu boş bırakıldı ve standart 1-2-3-4-5 kuyucuklardan her birine 50 µl aynı numaralı standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
- Plate üzeri membranla kapatılıp hafifçe çalkaladıktan sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından plate 5 kere yıkandı. Ardından Chromogen solüsyon A, B eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Ardından tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyon eklendi ve absorbans miktarları ölçülmek üzere mikropate okuyucu cihazında 450 nm dalga boyutunda yürütüldü.

3.8. İstatistiksel Analiz

B16F10, CD133⁺, CD133⁻ hücre sayıları ile tümör hacmi (mm³) değerleri ortalama ve standart hata üzerine temel istatistiksel analizler olarak Excel (Microsoft) veya GraphPad Prism yazılımındaki (Graphpad) uygun paketler kullanılarak gerçekleştirildi. Ornidazole ile tedavinin ardından, muameleler arasında karşılaştırma, varyans analizi (ANOVA) ve ardından Dunnett testinin çoklu karşılaştırması (2'den fazla veri seti değerlendirildi) veya Bonferroni testi kullanılarak yapıldı. Kontrol grubu olarak hiç işlem görmemiş (tedavi edilmemiş) grup kullanıldı. * P <0.05; ** P <0.01; ve *** P <0.001.

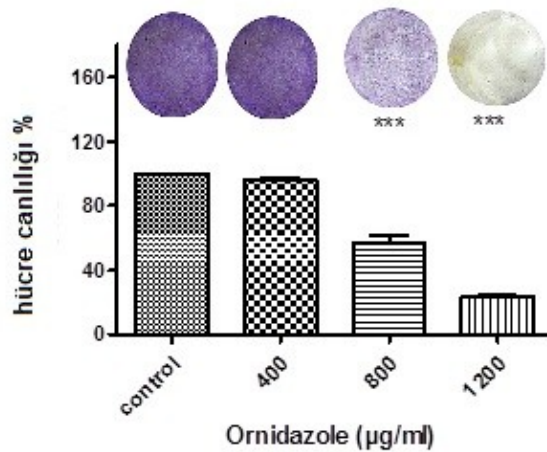
DNA hasar dağılımı, kuyruk momenti (kuyruk uzunluğunun ve DNA fraksiyonunun ürünü) için Casplab yazılımı kullanıldı.



4. BULGULAR

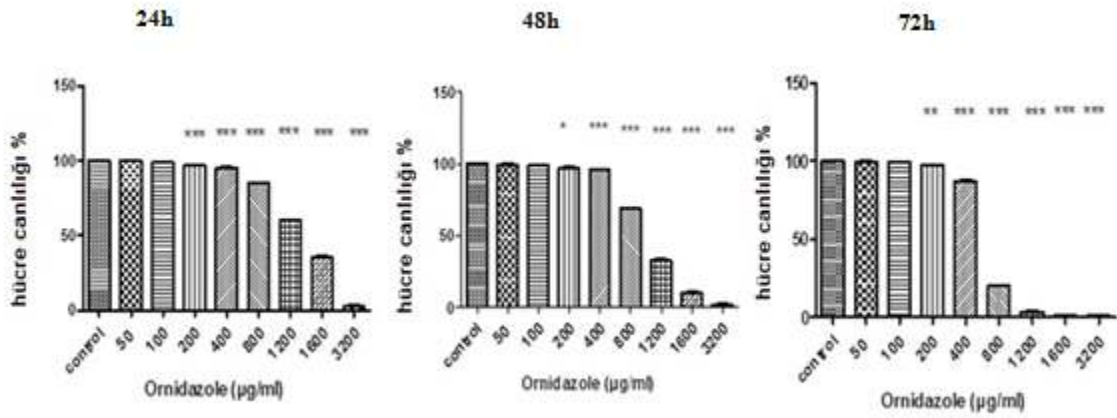
Melanoma hücre hattında (B16F10) ve tümör oluşumu gözlenen deney hayvanlarında antiparaziter özellikteki etken madde olan Ornidazole'un bazı Kanser Kök Hücreleri ve bu KKH'lerinin düzenleyici mekanizmaları üzerine etkisinin yanısıra ER stresi, apoptoz ve otofaji yolakları üzerine olan etkisi araştırılmış olup elde edilen bulgular özetlenmiştir.

1. Melanoma kanser hücreleri Ornidazole içermeyen ve farklı dozlarda Ornidazole içeren besi yeri ortamında kültüre edilmiştir. Ornidazole ile muamele edilmiş olan hücreler ile kontrol hücrelerinin bu ortamlarda hayatta kalma yüzdeleri kıyaslandığında Ornidazole ile muamele edilmiş hücrelerin canlılık yüzdesinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Kristalviole sonucuna göre Ornidazole ile muamele edilmiş olan melanom hücrelerinin besiyeri ortamında 48. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla, hücre canlılığı sırasıyla 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de %55, %20 olup, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde canlılığını sürdüremediği gözlemlenmiştir. ***P value < 0.001 seviyesinde olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler üç bağımsız deneyin $\pm$ S.D. (error bar) ortalaması olarak sunuldu.



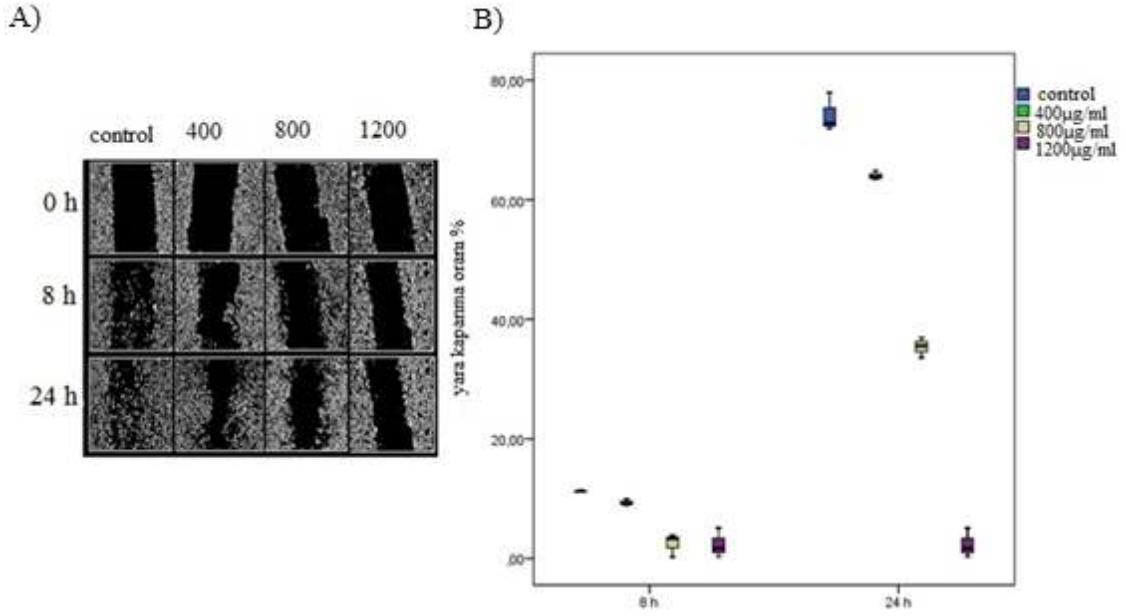
Şekil 6. Farklı dozlarda Ornidazole uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.

2. Melanoma hücrelerinin Ornidazole ile muamele edilmiş kombinasyonlarının (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 800 µg/ml, 1200 µg/ml, 1600 µg/ml ve 3600 µg/ml) dozlarının 24, 48 ve 72 saat boyunca B16F10 hücreleri üzerine MTT deneyi ile ölçülen hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Bu sonuca göre Ornidazole'un melanoma hücrelerinin hayatta kalmasını önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Farklılıklar *P<0.05; **P<0.01; ve ***P<0.001 seviyesinde olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler üç bağımsız deneyin $\pm$ S.D. (error bar) ortalaması olarak sunuldu.



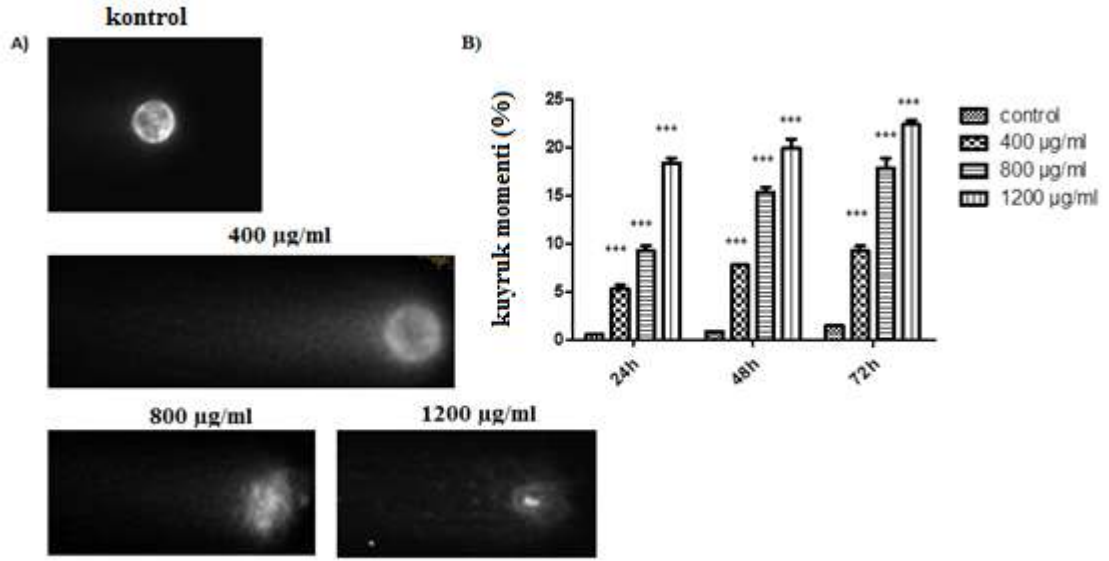
Şekil 7. B16F10 hücre hattında farklı dozlarda Ornidazole uygulamasının 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücre canlılığına etkisini gösteren grafik.

3. B16F10 melanoma hücre göçü, yara iyileşme deneyleri kullanılarak değerlendirildi. Ornidazole'un melanoma hücre migrasyonu üzerine önemli derecede etkisi olduğu gözlemlendi. Aynı bölgeden fotoğraflar, yaranın ardından 0, 8 ve 24 saat sonra çekildi. Büyütme:10X, göç miktarının ölçülmesi kapanan yaranın yüzdesi olarak ifade edilir. Veriler üç bağımsız deneyin $\pm$ S.D. (error bar) ortalaması olarak alınmış ve aralarındaki farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır (**p < 0.001).



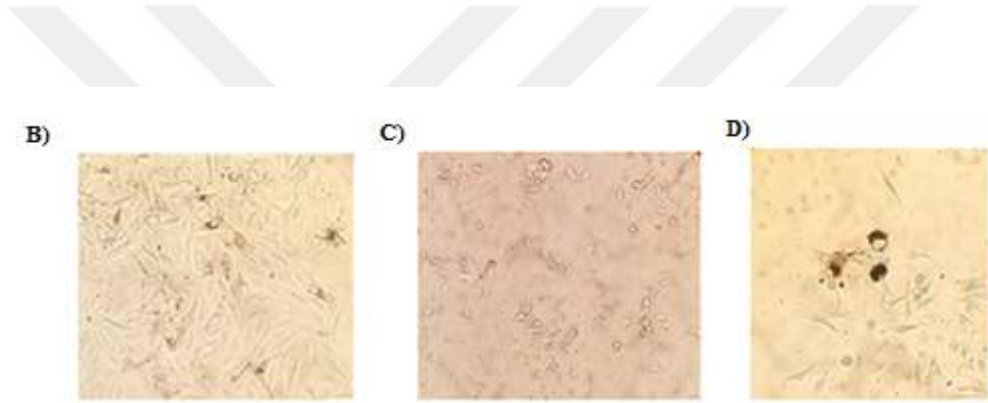
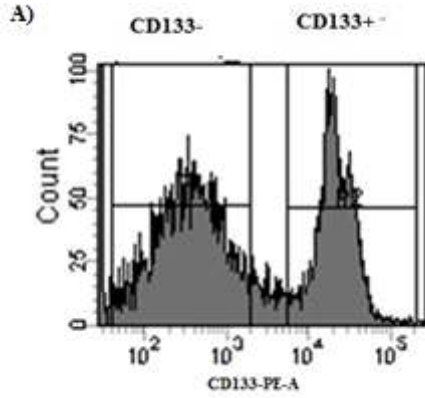
Şekil 8. Ornidazole'un melanoma hücre migrasyonu üzerine etkisi. **A)** Ornidazole uygulamasının ardından 8 ve 24. saat sonrası **B)** Yara kapanma oranları. Üç bağımsız deneyin ortalaması gösterilmektedir.

- Ornidazol'un B16F10 melanoma kanser hücrelerinde DNA hasarını indüklediği comet deneyi ile belirlendi. 6 kuyucuklu plakalarda 3×10^5 hücre / kuyucuk yoğunluğundaki hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda Ornidazol ile maruz bırakıldı ve sonuçlar, Ornidazol'un B16F10 melanoma kanser hücrelerinde DNA hasarını doza bağlı bir şekilde artırdığı saptandı. Yüksek Ornidazole konsantrasyonunun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha uzun DNA göç yayılmalarına (kuyruklu yıldız kuyruğu) neden olduğu görüldü. Veriler üç bağımsız deneyin $\pm$ S.D. (error bar) ortalaması olarak sunulmuş olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***) ($p < 0.001$).



Şekil 9. A) Hasar dağılımı, kuyruk momenti (kuyruk uzunluğunun ve DNA fraksiyonunun ürünü) olarak ölçüldü. Ortalama kuyruk momenti (μm), yapışan hücrelerdeki hasar dağılımını temsil eder. **B)** Ortalama kuyruk momenti (μm), hücrelerdeki hasar dağılımını temsil eder. Üç bağımsız deneyden ortalama $\pm$ SD (standart hata) gösterilmektedir *** $p < 0,001$.

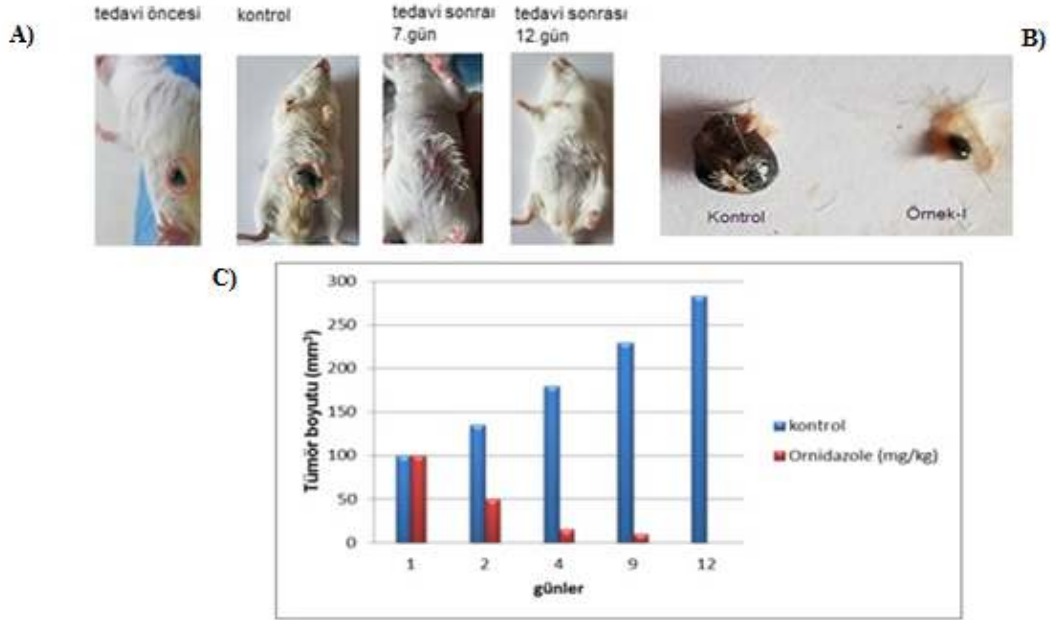
5. B16F10 melanoma kanser hücre hattından CD133^+ ve CD133^- kanser kök hücreleri flow sitometri (FACS) ile saflaştırıldı. Ayırma işleminden sonra CD133^+ ve CD133^- hücreleri santrifüj edilerek SF ile yıkanarak taze DMEM (GIBCO,USA) ortamı ile yeniden süspanse edildi. Kültür ortamı iki günde bir değiştirildi ve inverted faz kontrast mikroskobu altında 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saatte hücre proliferasyonu gözlemlendi.



Şekil 10. B16F10 melanoma kanser hücrelerinde ve CD133⁺, CD133⁻ flow sitometri analizi. İnverted faz kontrast mikroskobu altında gözlemlenen **A)** FACS analiz sonucu **B)** B16F10 (unsorted), **C)** CD133 + ve **D)** CD133- hücreleri.

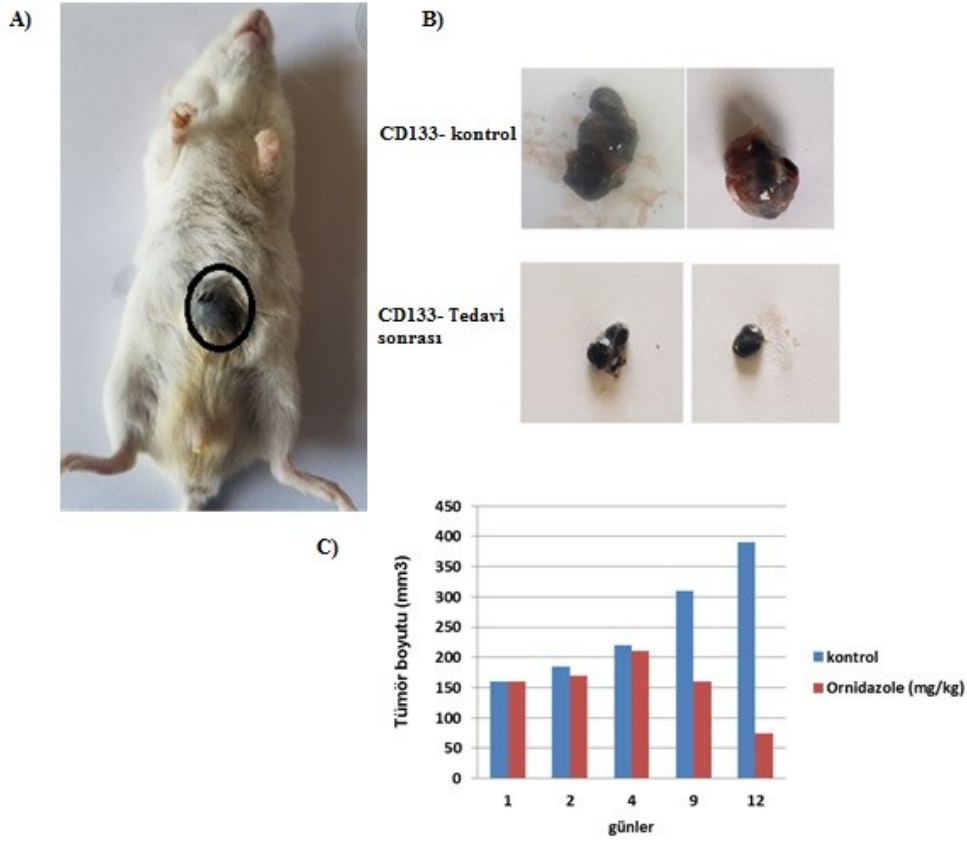
6. Unsorted, CD133⁺ ve CD133⁻ hücre solüsyonları (5×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edilen melanoma hücrelerinin 100 mm^3 ulaşması beklendikten sonra Ornidazole ile tedaviye başlandı. Bunun sonucuna göre;
 - 100 mm^3 boyutuna ulaşan farelere İntraperitoneal olarak (i.p.) Ornidazol, (80 mg / kg vücut ağırlığı) ile 12 gün boyunca tedavi edilen **unsorted grupların** 3 tanesinde tamamen iyileşme (tümör dokusunun tamamen kaybı) ve diğer 3 örnekte ise %96 oranında küçülme gözlenirken, Ornidazol ile tedavi edilmeyen gruplarda ise tümör büyüklüğü %200 oranında artış gözlemlendi. **Bu sonuçlara göre; ornidazole uygulamasının farelerin**

%50'sinde tümörün tamamen ortadan kalkmasını sağladığı ve diğer %50'sinde ise %96 oranında küçülmesi nedeniyle Ornidozole'ün melanoma üzerinde tedavi edici özelliğini ortaya çıkarmıştır.



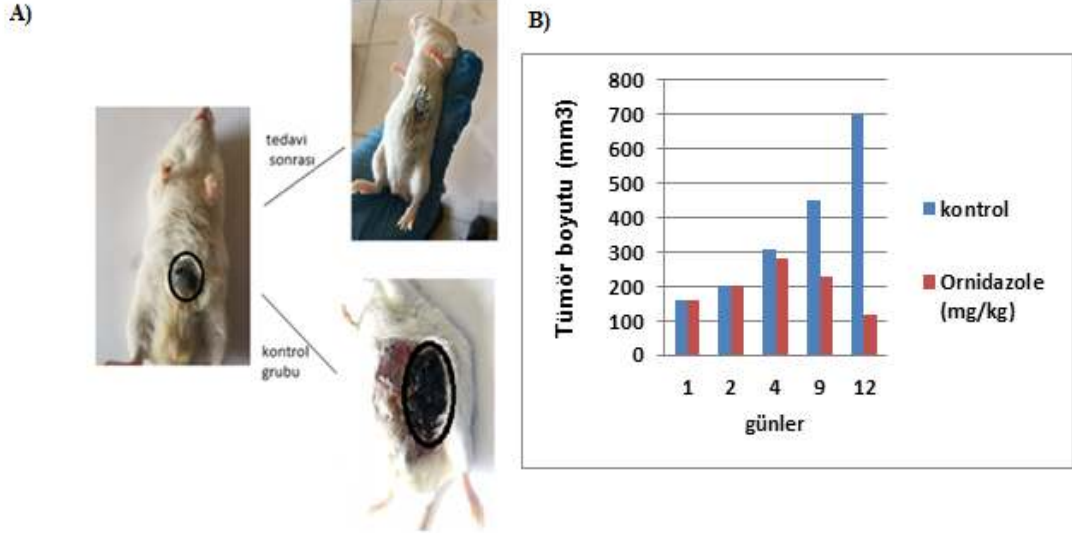
Şekil 11. unsorted hücreleri (5×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi. Tümör boyutu $\sim 100 \text{ mm}^3$ 'e ulaştıktan sonra, intraperitoneal olarak (i.p.) **A)** Ornidozole (Sigma, Germany) (80 mg / kg vücut ağırlığı) enjekte edildi (i.p) (12 gün boyunca) ve tümör hacimleri ölçüldü. Fareler sakrifiye edildi, **B)** Tümörler çıkarıldı ve fotoğraflandı. Tümör hacimleri $V = \text{uzunluk} \times \text{genişlik}^2 / 2$ kullanılarak ölçüldü. **C)** Tümör boyutundaki değişimler ile ilgili temel istatistiksel analizler Excel (Microsoft) kullanılarak yapılmıştır.

- **CD133⁻ gruplar:** Tümör boyutu $\sim 150 \text{ mm}^3$ boyutuna ulaştıktan sonra İntraperitoneal olarak (i.p.) Ornidozole (80 mg / kg vücut ağırlığı) ile 12 gün boyunca tedavi edilen **CD133⁻ gruplarda** ~ 60 oranında iyileşme (küçülme) gözlenirken, tedavi edilmeyen gruplarda ise tümör büyüklüğü ~ 150 oranında artış gözlemlendi.



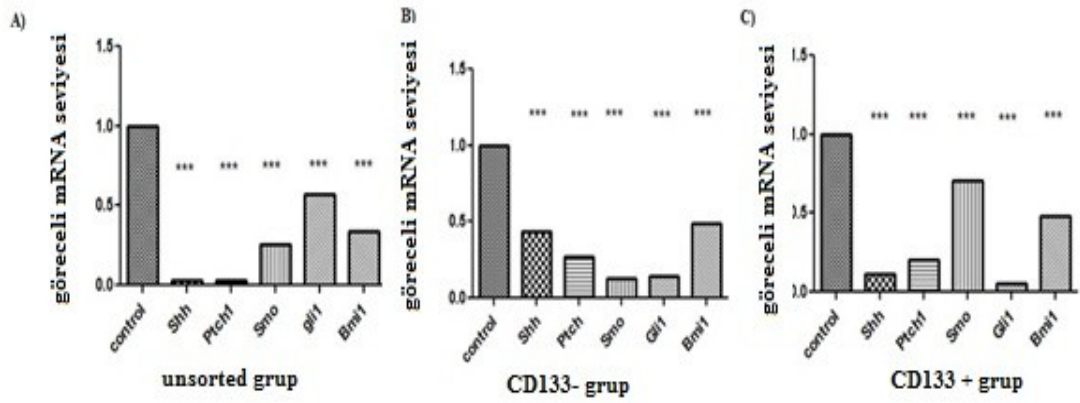
Şekil 12. B16F10 hücre hattından sort edilen CD133- hücreler (5×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi. Tümör boyutu $\sim 150 \text{ mm}^3$ 'e ulaştıktan sonra, intraperitoneal olarak (i.p.) **A)** Ornidazole (Sigma, Germany) (80 mg / kg vücut ağırlığı) ile (12 gün boyunca) tedavi edildi ve tümör hacimleri ölçüldü. Fareler sakrifiye edildi, **B)** tümörler çıkarıldı ve fotoğraflandı. Tümör hacimleri $V = \text{uzunluk} \times \text{genişlik} / 2$ kullanılarak ölçüldü. **C)** Tümör boyutundaki değişmeler ile ilgili temel istatistiksel analizler Excel (Microsoft) kullanılarak yapılmıştır.

- **CD133⁺ gruplar:** Tümör boyutu $\sim 150 \text{ mm}^3$ boyutuna ulaştıktan sonra İntraperitoneal olarak (i.p.) Ornidazole (80 mg / kg vücut ağırlığı) ile 12 gün boyunca tedavi edilen **CD133⁺ gruplarda** ~ 50 oranında iyileşme (küçülme) gözlenirken, tedavi edilmeyen gruplarda ise tümör büyüklüğünde ~ 337.5 oranında artış gözlemlendi.



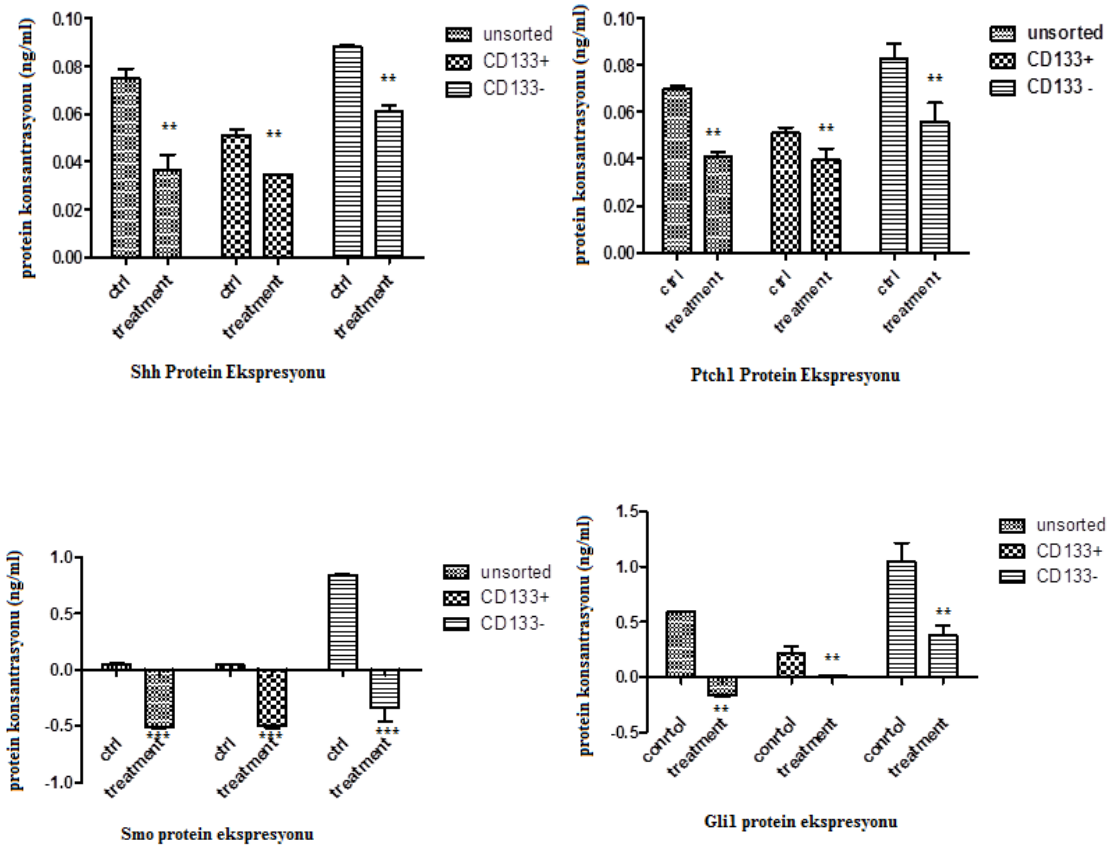
Şekil 13. B16F10 hücre hattından sort edilen CD133+ hücreler (1×10^5) subkutan olarak Swiss albino farelerine enjekte edildi. Tümör boyutu 150 mm³'e ulaştıktan sonra, intraperitoneal olarak (i.p.) A) Ornidazole (Sigma, Germany) 80 mg / kg vücut ağırlığı) ile (12 gün boyunca) tedavi edildi ve tümör hacimleri ölçüldü. Fareler sakrifiye edildi. B) Tümör boyutundaki değişimler ile ilgili temel istatistiksel analizler Excel (Microsoft) kullanılarak yapılmıştır.

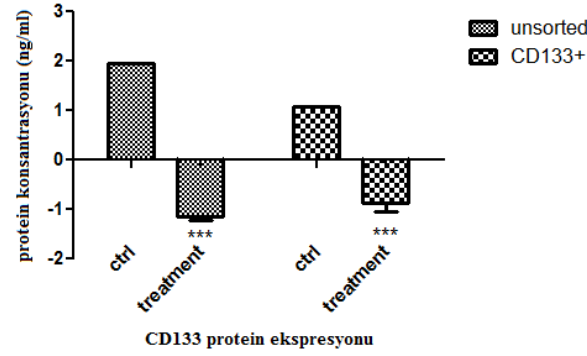
- Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, Hedgehog sinyal yolağı ile ilişkili olan Shh, Ptch1, Smo, Gli1 ve Bmi1 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA ve protein düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede azalma gözlenmiştir. ***P value<0.001, **P value<0.01, n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.



Şekil 14. Ornidazole ile tedavi sonrasında, hedgehog yolağı ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafikler, **A)** Unsorted grup **B)** CD133- grup ve **C)** CD133+ grup

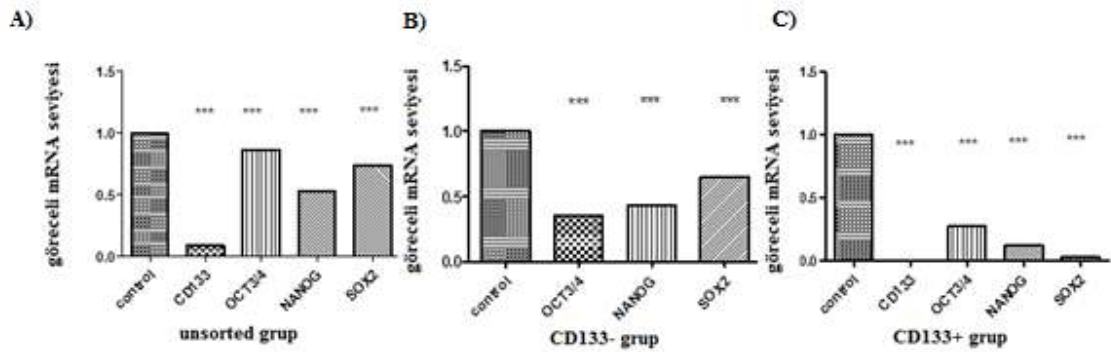
***P value < 0.001. n=6 grup başına.





Şekil 15. Ornidazole'ün melanom kanser hücrelerinde Shh, Ptch1, Smo, Gli1 ve CD133'ün protein ekspresyonu üzerindeki etkileri. Shh, Ptch1, Smo, Gli1 ve CD133 proteinlerinin ifadesi ELİSA assay ile ölçülmüştür ***P value < 0.001, **P value< 0.01 n=6 grup başına.

8. Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, kanser kök hücreleri ile ilişkili olan CD133, OCT3/4, NANOG ve SOX2 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede azalma gözlenmiştir. ***P value<0.001. n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.

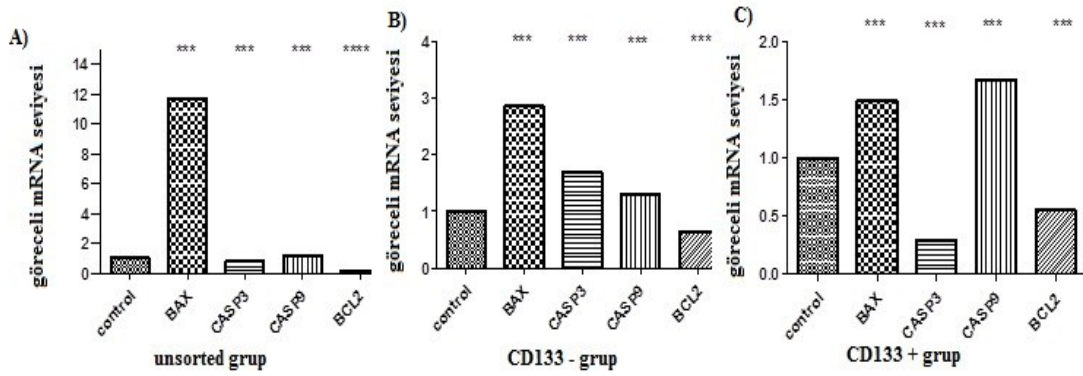


Şekil 16. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, kök hücre belirteçleri ve Yamanaka faktörleri ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.

***P value < 0.001. n=6 grup başına.

9. Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, apoptozis ile ilişkili olan BAX, CASP3, CASP9 ve BCL2 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede artma ve azalma gözlenmiştir. ***P value<0.001. n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.

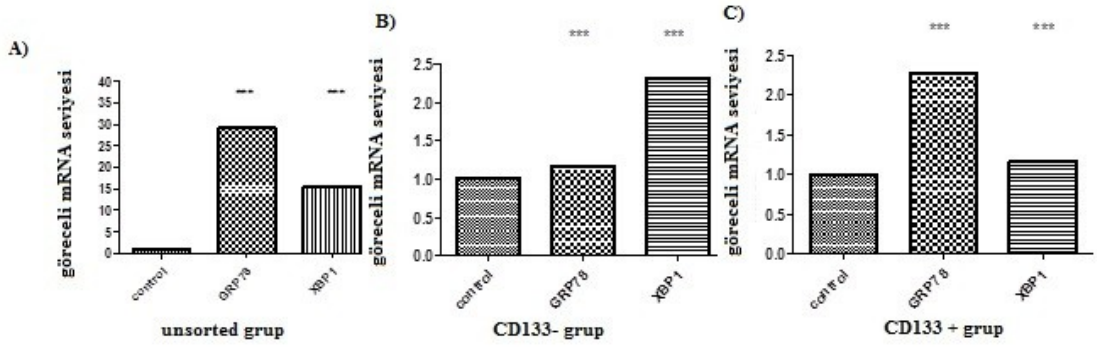
CASP3 bakımından CD133⁺, unsorted ve CD133⁻ gruplar arasında mRNA düzeyinde ekspresyon bakımından istatistiksel anlamda farklılıklar saptandı.



Şekil 17. A) Unsorted B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, Apoptozis ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.

***P value < 0.001. n=6 grup başına.

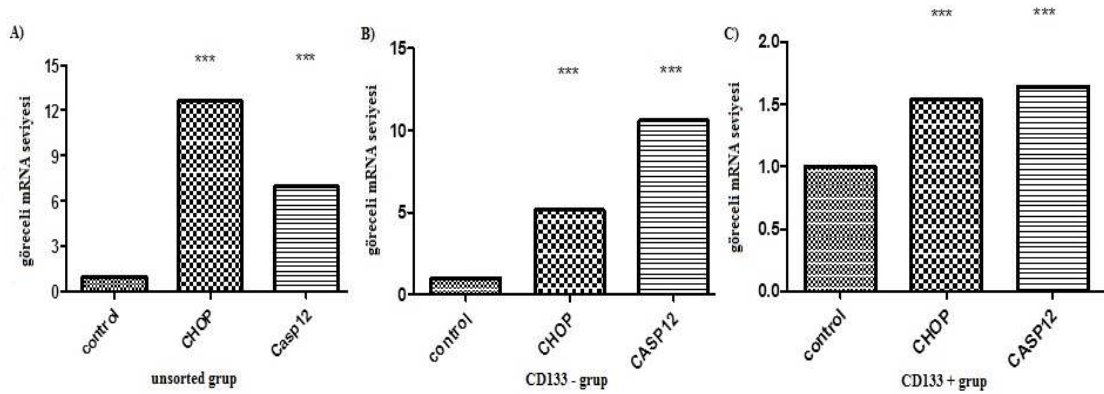
10. Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, ER stresi ile ilişkili olan Grp78 ve XBP1 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede artış gözlenmiştir. ***P<0.001. n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.



Şekil 18. A) Unsorted grup **B)** CD133- grup ve **C)** CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik.

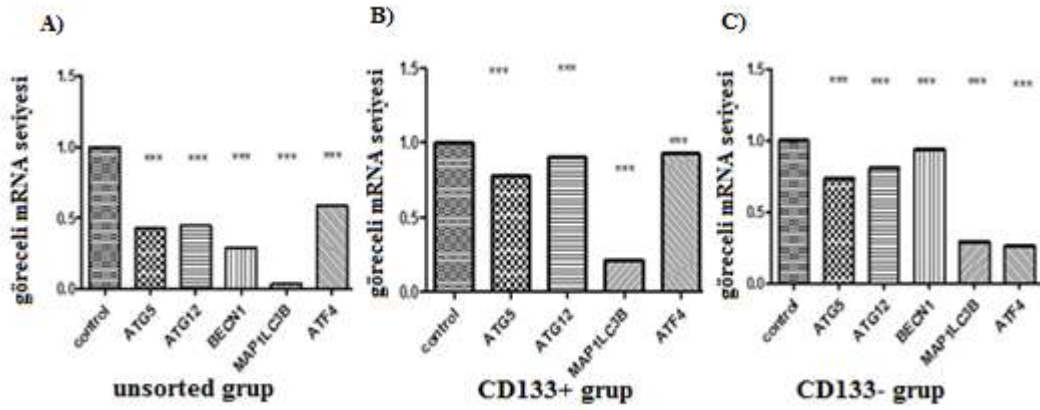
***P value < 0.001. n=6 grup başına.

- Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, ER stresi aracılı apoptozis ile ilişkili olan Chop ve Casp12 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede artış gözlenmiştir. ***P value<0.001. n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.



Şekil 19. A) Unsorted grup **B)** CD133- grup ve **C)** CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi aracılı apoptozis ile ilişkili genlerinin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik. ***P value < 0.001. n=6 grup başına.

12. Ornidazole ile tedavi sonrasında çıkarılan tümör dokularından, ER stresi aracılı otofaji ile ilişkili olan ATG5, ATG12, BECN1, MAP1LC3B ve ATF4 genlerinin ekspresyon seviyesine mRNA düzeyinde bakılmış ve melanoma hücrelerinin kontrole kıyasla istatistiksel anlamda bu genlerin ifade düzeylerinde önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. ***P value<0.001. n=6 grup başına. Veriler üç bağımsız deneyin ortalaması olarak sunuldu.



Şekil 20. A) Unsorted grup B) CD133- grup ve C) CD133+ deney gruplarının Ornidazole ile tedavi sonrasında, ER stresi aracılı otofaji ile ilişkili genlerin göreceli mRNA seviyesini gösteren grafik. *P value < 0.001. n=6 grup başına.**

5. TARTIŞMA

5-nitroimidazol ilaç ailesinin bir üyesi olan ornidazol, insanlarda ve hayvanlarda protozoan ve anaerobik bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır⁹⁵. Yeni bir ilaç geliştirmenin milyar dolarlara mal olabileceği bir zamanda, mevcut ilaçların yeniden kullanımı fikri oldukça cazip olmakla birlikte Hh sinyal yolağı birçok kanser çeşidinde aktive edilir ve bu nedenle yeni anti kanser ajanlar için ilgi çekici bir hedef oluşturmaktadır. KKH'lerin düzenleyici mekanizmalarının hedeflenmesi daha etkili klinik öncesi tedavilerin geliştirilmesi için gereklidir.

Kanser hücrelerinin spesifik olarak hedeflenememesi nedeniyle geleneksel anti-kanser özellikteki kemoteröpatik ajanların tümördeki malign hücrelerin tamamını ortadan kaldıramamasından kaynaklanan, nüks ve direnç gelişimi nedeniyle potansiyel olarak etkisizdirler. Bu geleneksel yaklaşımdaki KKH'lerini ihmal eden veya yok sayan stratejilerin kanser tedavisini oldukça zorlaştırdığı sonuçlarından anlaşılmaktadır. Yeni ilaç araştırmalarındaki maliyet ve zaman dezavantajı nedeniyle mevcut anti-mitotik potansiyeli olan ilaçların kanser tedavilerinde denenmesi güncel bir yaklaşımdır. Bu nedenle çalışmamızda, KKH'lerini de ortadan kaldırma potansiyeli taşıyan bazı anti-paraziter ilaçların malign melanomun tedavisinde başarılı olabileceği ihtimalini düşündürmüştür. Melanomada yaygın olarak kullanılan bazı kemoterapötik maddelerin, göreceli bir tedavi edici niteliği olmakla birlikte çeşitli yan etkilere sahip ilaçlardır. Nitekim, melanoma olgularında konvansiyonel tedavilere karşı direncin çok sık meydana gelmesi; Melanoma-spesifik KKH'lerini, KKH'lerini düzenleyici mekanizmaları ve sinyal yollarını spesifik olarak hedef alan yeni etkili ve seçici terapötik kimyasalların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Anaerob hücrelere pasif difüzyon ile girebilmenin yanı sıra hücre DNA'sına bağlanarak, DNA sarmalının destabilizasyonu ve iplik kırılması ve DNA sentezini inhibe etme özellikleri nedeniyle Ornidazole'un melanoma ve KKH'lerinde etkili olabileceğini düşündük.

Tümör hücre göçü, metastaz ve invazyonla olan yakın ilişkisinden dolayı tümör ilerlemesinin önemli bir belirteçidir⁹⁶. Bu nedenle, melanoma hücre göçünü engelleyen hedeflerin belirlenmesi çok önemlidir. Bulgularımız, melanom hücrelerinin, yara açma deneyinde (wound-healing assay) görüldüğü gibi yüksek derecede invazyon yeteneğine

sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda, ornidazol'un melanoma da kanser hücre göçünü etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve bunun yanısıra kontrol gruplarına göre zamana ve doza bağlı olarak DNA hasarını şiddetlendirdiğini gözlemledik. Ek olarak, kontrol ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında ornidazole ile tedaviden sonra hücre canlılığının inhibe edildiğini ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdik. Melanoma konusunda Ornidazole ile elde ettiğimiz deney bulgularımızın tümör progresyonunu baskılaması ve hücre metastazını inhibe etmesi, hedef kanser hücrelerinde DNA hasarını şiddetlendirmesi oldukça dikkat çekicidir. Yaptığımız literatür taramasında Ornidazole'un melanoma kanseri konusunda, bu özelliklerini gösteren herhangi çalışmanın bulunmaması bulgularımızın önemini daha da artırmaktadır.

Kök hücre özelliklerinin sürdürülmesi ve farklılaşmasında çok önemli rol oynayan Hedgehog sinyal yolağının KKH'le olan ilişkisi yeni anti-kanser ilaçlar için kendisini bir hedef haline getirmiştir. Melanom insidansı ve ölüm oranı her geçen gün artmakta ve metastatik melanoma hastaları için tedavi bulunmamaktadır. Melanoma ile ilgili yapılan çalışmalarda; tümör gelişimi, metastaz, direnç ve nüks olaylarında Shh sinyal yolağının önemli rol oynadığı gösterilmiştir⁹⁷. Melanoma modeli olarak melanositlerle yapılan çalışmaların % 40'ından fazlasında, Shh yolağı aracıları olan; SMO, GLI2 ve PTCH1'in önemli ölçüde yüksek ifade düzeyi gösterdiğini ortaya koymuştur⁶⁸. Çalışmamızda, Shh sinyal yolağını baskılamak amacıyla in-vivo olarak IP ornidazole uygulaması yapıldı. Uygulama sonunda Ornidazole'un melanoma büyümesini engellediğini, nüksü ve metastazları önlediğini gösterdik. B16F10 (Unsorted grup) fare melanoma modellerinden 3 tanesinde tamamen iyileşme (tümör dokusunun tamamen kaybı) ve diğer 3 örnekte %96 oranında küçülme saptanırken, Ornidazole uygulanmayan kontrol gruplarında ise tümör büyüklüğünde %200 oranında artış saptandı. CD133⁺ melanoma fare modellerinde uygulanan Ornidazole ile ~%50 oranında iyileşme saptanırken, kontrol gruplarında ise bunun aksine tümör büyüklüğünde ~%337.5 oranında artış saptandı. CD133⁻ melanoma fare modellerinde Ornidazole ile ~%60 oranında iyileşme saptanırken, tedavi edilmeyen gruplarda ise tümör büyüklüğü ~%150 oranında artış saptandı. Saptadığımız bu bulgularla ilgili olarak tümör boyutlarındaki tedavi oranlarına baktığımızda CD133⁺'lerin tümör dokusu içerisindeki klonalite açısından kanser kök hücre özelliklerinin sorgulanmasına neden olurken, invazyon ve metastaz gibi kanserin

daha ileri boyutlarında ki rolü nedeniyle CD133+'lerin çok çok önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Nitekim çalışmamızda, CD133+ fare modellerinin kontrol gruplarında yüksek oranda metastazın saptanması hem bunun rastlantı ile meydana gelmediğinin bir göstergesi hem de CD133'ün melanoma kanserleri için kök hücre özelliğini teyit etmesi bakımından dikkat çekicidir.

Saptadığımız bu önemli bulgularla ilgili olarak yaptığımız literatür taramasında, melanoma kanseri ile ilgili Ornidazole uygulaması yapılmış herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Sadece anti-helminetik amaçlı kullanılan Mebendazole aracılı Shh üzerinden medullablastoma da tümör progresyonunda yavaşlama ve intestinal tübul sentezinde inhibisyon bulgularını ön plana çıkaran tek bir çalışmaya rastlanmıştır⁹⁸. Ayrıca anti-paraziter özellikteki farklı bileşenlerle yapılan birçok çalışmanın farklı kanser türlerinde uygulanmış olması, çalışmamızın melanoma kanseri açısından önemini bir kez daha öne çıkarmaktadır.

Kök hücre belirteçleri olarak bilinen; OCT3/4 SOX2, NANOG gibi transkripsiyon faktörleri ile CD133'ün pluripotensi, kendi kendini yenileme, tümör farklılaşmasında önemli düzenleyiciler olduğu kabul edilir³. Çalışmamızda, melanoma hücrelerinde Ornidazole ile tedavinin ardından bu genlerin ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla istatistiksel anlamda önemli bir düşüş gözlemledik. Melanoma ile ilgili yapılan çalışmalarda CD133 ve ABCG2, ABCB5 ve CD271'i ifade eden hücre yüzey belirteçlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. Nordvig ve ark. CD133⁺ keratinositlerin, melanom dışı deri kanserinde klinik etkileri olabilen yüksek mitokondriyal potansiyel sergilediğini bildirmiştir. Ayrıca Kumar ve ark. CD133⁺ melanoma spesifik KKH'lerin in vivo koşullar altında uzun vadeli tümörjenik potansiyeli koruduğunu göstermişlerdir. Daha da önemlisi OCT4, NANOG, SOX2 ve CD133 gibi köklülük ile ilgili transkripsiyon faktörleri ve belirteçler kanser düğmesini kapatabilme özelliklerinden dolayı klinik uygulamalar için büyük umut vaat etmektedir. Çalışmamızda Ornidazole ile ilgili olarak elde ettiğimiz bulgular, Shh sinyal yolağı ile ilişkili neoplazilerin inhibisyonu için yeni bir anti-tümör ajan olma potansiyelini göstermesi bakımından dikkat çekicidir.

Çalışmamızda CD133- melanoma fare modeli gruplarımızda Ornidazole uygulamasının ardından artmış Casp3 ifadesi gözlenirken, unsorted ve CD133+ melanoma fare modeli gruplarımızda ise Casp3 ifadesinin azaldığını saptadık.

Normalde, artmış Casp3 aktivitesi apoptozun bir işareti ve kanser tedavisinde olumlu bir etkinlik göstergesi olarak kabul edilir. Ancak Casp3'ün kanser hücresi büyümesini, hücrel göçü, invazivliği, tümör nüksetmesini ve anjiyogenezini desteklediğine dair de artan kanıtlar vardır^{99,100}. Min Zhou ve ark. Casp3 knockout hücrelerinin önemli ölçüde daha az göç ve istila kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir¹⁰¹. Bu nedende saptadığımız azalmış Casp3 aktivitesi çelişkili bir duruma işaret ediyor gibi görünse de, Casp3'ün farklı kaynaklardan beslenen kavşak noktasındaki rolünden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu tezimizin doğrulanması için casp3'ün hangi kaynaktan beslendiğini gösterecek ikinci bir belirteç ihtiyacı olduğunu ve bizim elimizde böyle bir verinin olmadığını da belirtmek gerekir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler ışığında genel olarak apoptoza dirençli olan malign melanoma tümör dokusuna uygulanan Ornidazole tarafından indüklenen apoptoz'un, muhtemelen BCL-2 ekspresyonunu azaltarak ve BAX'ı upregüle ederek gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Bu nedenle Ornidazole'un apoptozu destekleyerek melanoma kanseri hücrelerinde anti-kanser etkiliği artırdığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, Unsorted, CD133⁺ ve CD133⁻ gruplarında, Ornidazol'un hücrel stres belirteçleri olan GRP78 ve Xbp1 ekspresyon seviyeleri ve ER stres aracılı apoptoz belirteçleri olan Chop ve Casp12 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğunu belirledik. Ekstrem olmayan fizyolojik koşullara göre adapte olmuş normal hücrelerin, kronik şekilde ER stresine sahip olan ve bu stresten beslenen kanser hücrelerine kıyasla UPR tercihi görece daha azdır. Kanser hücrelerine avantaj sağlayan stres durumları eğer stres eşliğinin aşıldığı durumlara dönüşürse kanser hücrelerinin aleyhine gelişen bir süreç olarak şekillenir. Birçok farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalar, GRP78 miktarındaki artışın dikkate değer olduğunu ve bu nedenle kanserde terapötik hedef olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır^{102,103}. GRP78'in, kanser gelişiminde bir belirteç olmasının yanı sıra anti-kanser amaçlı olarak da, kemoterapik ilaçlara olan hassasiyetin artırılması, metastaz ve invazyonun azaltılması için inhibisyonu hedeflenen önemli ve umut vadeden bir tedavi stratejisi olarak düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda tümör dokusunun; ER stres, hipoksi, enflamasyon ve anjiyogeneze olan eğilimini azaltmak/önlemek için UPR'nin hedeflenmesi yeni tedavi stratejileri bakımından öne çıkmaktadır.

Henüz KKH aracılı melanoma büyümesinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak belirlenememiştir. Ayrıca, Günümüze kadar, Shh ve otofaji arasındaki ilişkiye duyarlı kanserler gösterilmiş olmasına rağmen, melanoma KKH'de otofaji ve ER stresi arasındaki ilişki rapor edilmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda Ornidazole'un, KKH'lerinde; ER stres, apoptoz ve otofaji ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda, ER stresi aracılı otofaji ile ilişkili olan ATG5, ATG12, BECN1, MAP1LC3B ve ATF4 genlerinin ekspresyonuna bakılmıştır. Melanoma fare modellerinde (unsorted, CD133+ ve CD133-) İP Ornidazole uygulaması yapılarak ilgili genlerin ekspresyon profilleri kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak melanoma tümör büyümesinde rol oynayan ER stres-aracılı otofaji ile ilgili tanımlanmış genlerin ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılandığını saptadık. kanser hücrelerinin olumsuz çevre koşullarına karşı sağkalım şanslarını artıran ve geleneksel kemoterapiye karşı direnç sağlayan adaptasyonların kazanılmasında başrol oynayan tümör mikroçevresinin önemi bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; artmış ATF4 ekspresyonunun, tümör hücre proliferasyonunu yönlendiren genlerin transkripsiyonunu modüle ederek tümör genезini kolaylaştırdığı ve ayrıca STAT3'ün aktivasyonu aracılığıyla, kanser tedavisinde büyük bir sorun olan MDR (çoklu ilaç direncini) ile ilgili genlerin ekspresyonunu da teşvik ettiği gösterilmiştir. Son zamanlarda otofajinin yüksek bir malignite oranıyla ilişkili olabileceği, tümör hücresi göçünü ve invazyonunu desteklediği ve kemoterapi direncini indüklediği bildirilmiştir¹⁹. Çeşitli çalışmalar, hücre göçü ve istilası sırasında fokal adhezyon dinamiklerinde otofajinin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Özellikle fokal adezyonun parçalanmasının azalması üzerinden işleyen otofajinin inhibisyonunun tümör hücresi hareketliliğini azalttığı saptanmıştır^{104,105}. Bu nedenle çalışmamızın otofaji ile ilgili olarak seçilmiş genler üzerinden Ornidazole aracılığıyla tümör progresyonunu geriletmediği sonucu önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak Ornidazole'un melanoma tedavisinde potansiyel bir etkiye sahip olduğunu melanoma fare modelleriyle yaptığımız çalışmamızda ilk kez gösterdik. Ayrıca, çalışmamızda ilk kez ornidazol'un melanoma fare modellerinde Shh, apoptozis, ER stres, ER stres aracılı otofaji ve ER stres aracılı apoptoz bileşenleri üzerindeki anti-kanser etkilerini gösterdik.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ornidazole'ün melanoma kanser hücreleri üzerine olan etkisini in-vitro ve in-vivo olarak gösterdiğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Ornidazole B16F10 kanser hücrelerinin canlılığını dikkate değer oranda ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe etmektedir.
2. Ornidazole melanoma hücrelerinin göç ve invazyon yeteneklerini baskılamaktadır.
3. Ornidazole zamana ve doza bağlı olarak DNA hasarını artırmaktadır.
4. Ornidazole in-vivo unsorted, CD133⁺ ve CD133⁻ fare melanoma modellerinde tümör boyutlarının hacimlerini azaltmaktadır.
5. Ornidazole uygulamasından sonra, CD133 ve Shh sinyal yolağı ile ilişkili genlerin ifade düzeyleri hem mRNA hem de protein miktarları bakımından azalma göstermiştir.
6. Ornidazole uygulamasından sonra, köklülük ile ilişkili genlerin ifade düzeyleri azalma göstermektedir.
7. İn-vivo CD133⁺ hücreleri daha tümörojeniktir.
8. Ornidazole melanoma hücrelerinde ER stresini artırmaktadır.
9. Ornidazole melanoma hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir.
10. Ornidazole, endoplazmik retikulum aracılı sinyal yolu aracılığıyla apoptozu indüklemektedir.
11. Ornidazole endoplazmik retikulum aracılığıyla otofajiyi baskılamaktadır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile Ornidazole'ün melanoma tedavisinde in-vitro ve in-vivo olarak potansiyel bir etkiye sahip olduğunu saptadık. Bu nedenle, çeşitli hayvan melanoma modellerinde ornidazole'ün anti-kanser aktivitesinin test edilerek doğrulanması ve yeni ilaç adayı olarak klinik çalışmaların önünü açabilir.

7. KAYNAKLAR

- X1. **Khoobchandani M, Ganesh N, Gabbanini S, Valgimigli L, Srivastava MM.** Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth. *Fitoterapia*. **2011**; 82:647-653.
2. **Dawood S, Austin L, Cristofanilli M.** Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)*. **2014**; 28:1101-1107, 1110.
3. **Schatton T, Frank MH.** Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. **2008**; 21:39-55.
4. **Chin L, Garraway LA, Fisher DE.** Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. **2006**; 20:2149-2182.
5. **Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al.** Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer*.**2007**;43:935-946.
6. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*.**2001**; 414:105-111.
7. **Baccelli I, Trumpp A.** The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol*.**2012**; 198:281-293.
8. **Civenni G, Walter A, Kobert N, et al.** Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res*.**2011**; 71:3098-3109.
9. **Kumar D, Kumar S, Gorain M, et al.** Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133(+) Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. *J Invest Dermatol*.**2016**; 136:2462-2474.
10. **Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW.** Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)*.**2016**;8.
11. **Katoh Y, Katoh M.** Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*.**2009**; 9:873-886.
12. **Lessard J, Sauvageau G.** Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*.**2003**; 423:255-260.
13. **Kurt O, Girginkardeşler N, Balcioglu IC, Ozbilgin A, Ok UZ.** A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clin Microbiol Infect*.**2008**; 14:601-604.
14. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*.**2011**;144:646-674.
15. **Sever R, Brugge JS.** Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*.**2015**;5.
16. **Green DR, Llambi F.** Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.**2015**;7.
17. **Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al.** The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*.**2004**; 432:1032-1036.

18. **Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al.** Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*.**2006**; 10:51-64.
19. **Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF.** Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *Febs j*.**2018**; 285:1751-1766.
20. **Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*.**2010**; 141:52-67.
21. **Curran S, Murray GI.** Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*.**2000**; 36:1621-1630.
22. **Devreotes P, Horwitz AR.** Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.**2015**;7:a005959.
23. **Pavlova NN, Thompson CB.** The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*.**2016**;23:27-47.
24. **Cairns RA, Harris IS, Mak TW.** Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*.**2011**; 11:85-95.
25. **Kim SY.** Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. *Biomol Ther (Seoul)*.**2018**; 26:39-44.
26. **Weitzenfeld P, Ben-Baruch A.** The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer. *Cancer Lett*.**2014**;352:36-53.
27. **Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, et al.** NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*.**2018**; 172:1022-1037.e1014.
28. **Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z.** Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*.**2018**; 32:1267-1284.
29. **Lewis CE, Pollard JW.** Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*.**2006**; 66:605-612.
30. **Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M.** Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*.**2006**;2:213-219.
31. **Reddel RR.** The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*.**2000**;21:477-484.
32. **Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.** Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*.**1994**; 266:2011-2015.
33. **Shay JW, Wright WE.** Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol*.**1996**;8:66-71.
34. **Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW.** Cancer genome landscapes. *Science*.**2013**; 339:1546-1558.
35. **Münger K, Howley PM.** Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*.**2002**; 89:213-228.
36. **Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al.** A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*.**1994**;367:645-648.

37. **Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.***2003**;100:3983-3988.
38. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.***2003**; 63:5821-5828.
39. **Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL.** Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.***2009**; 118:241-254.
40. **Ayob AZ, Ramasamy TS.** Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.***2018**; 25:20.
41. **Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ.** Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer.***2005**;5:899-904.
42. **Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al.** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.***2008**; 133:704-715.
43. **Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG.** Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.***2012**; 44:2144-2151.
44. **Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al.** Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.***2008**; 451:345-349.
45. **Samadani AA, Norollahi SE, Rashidy-Pour A, et al.** Cancer signaling pathways with a therapeutic approach: An overview in epigenetic regulations of cancer stem cells. *Biomed Pharmacother.***2018**;108:590-599.
46. **Muñoz P, Iliou MS, Esteller M.** Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming. *Mol Oncol.***2012**;6:620-636.
47. **Reya T, Clevers H.** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.***2005**;434:843-850.
48. **Gajos-Michniewicz A, Czyz M.** WNT Signaling in Melanoma. *Int J Mol Sci.***2020**;21.
49. **Lindvall C, Bu W, Williams BO, Li Y.** Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer. *Stem Cell Rev.***2007**; 3:157-168.
50. **Polakis P.** Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.***2012**;4.
51. **Benoit YD, Guezguez B, Boyd AL, Bhatia M.** Molecular pathways: epigenetic modulation of Wnt-glycogen synthase kinase-3 signaling to target human cancer stem cells. *Clin Cancer Res.***2014**; 20:5372-5378.
52. **Venkatesh V, Nataraj R, Thangaraj GS, et al.** Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig.***2018**;5:5.
53. **Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E.** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.***1980**;287:795-801.
54. **Xin M, Ji X, De La Cruz LK, Thareja S, Wang B.** Strategies to target the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. *Med Res Rev.***2018**; 38:870-913.
55. **Li C, Chi S, Xie J.** Hedgehog signaling in skin cancers. *Cell Signal.***2011**; 23:1235-1243.
56. **Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L.** The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.***2018**; 18:8-20.

57. **Rana R, Carroll CE, Lee HJ, et al.** Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signalling. *Nat Commun.***2013**; 4:2965.
58. **Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J.** Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature.***2004**; 432:1045-1050.
59. **Abbasi AA, Goode DK, Amir S, Grzeschik KH.** Evolution and functional diversification of the GLI family of transcription factors in vertebrates. *Evol Bioinform Online.***2009**;5:5-13.
60. **Santoni M, Burattini L, Nabissi M, et al.** Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci.***2013**;14:133-140.
61. **Sari IN, Phi LTH, Jun N, Wijaya YT, Lee S, Kwon HY.** Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells.***2018**;7.
62. **Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, et al.** Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.***1996**; 85:841-851.
63. **Gulino A, Ferretti E, De Smaele E.** Hedgehog signalling in colon cancer and stem cells. *EMBO Mol Med.***2009**;1:300-302.
64. **Szkandera J, Kiesslich T, Haybaeck J, Gerger A, Pichler M.** Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.***2013**; 14:1179-1196.
65. **Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, et al.** Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.***2004**;64:6071-6074.
66. **Sheng T, Li C, Zhang X, et al.** Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer.***2004**; 3:29.
67. **Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB.** Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.***2003**;422:313-317.
68. **O'Reilly KE, de Miera EV, Segura MF, et al.** Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel).***2013**;6:1429-1450.
69. **Becher OJ, Hambardzumyan D, Fomchenko EI, et al.** Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.***2008**;68:2241-2249.
70. **Jiang J, Hui CC.** Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell.***2008**;15:801-812.
71. **Theunissen JW, de Sauvage FJ.** Paracrine Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Res.***2009**;69:6007-6010.
72. **Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, et al.** Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.***2007**; 67:2187-2196.
73. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>.
74. *T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı*2016.
75. **Jimbow K, Roth SI, Fitzpatrick TB, Szabo G.** Mitotic activity in non-neoplastic melanocytes in vivo as determined by histochemical, autoradiographic, and electron microscope studies. *J Cell Biol.***1975**;66:663-670.

76. **Cui R, Widlund HR, Feige E, et al.** Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*.**2007**;128:853-864.
77. **Costin GE, Hearing VJ.** Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb j*.**2007**;21:976-994.
78. **Bataille V.** Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer*.**2003**;39:1341-1347.
79. **Solit D, Sawyers CL.** Drug discovery: How melanomas bypass new therapy. *Nature*.**2010**;468:902-903.
80. **Shain AH, Bastian BC.** From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*.**2016**;16:345-358.
81. **Al Dhaybi R, Sartelet H, Powell J, Kokta V.** Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Mod Pathol*.**2010**;23:376-380.
82. **Rappa G, Fodstad O, Lorico A.** The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells*.**2008**;26:3008-3017.
83. **Fusi A, Reichelt U, Busse A, et al.** Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J Invest Dermatol*.**2011**;131:487-494.
84. **Kampilafkos P, Melachrinou M, Kefalopoulou Z, Lakoumentas J, Sotiropoulou-Bonikou G.** Epigenetic modifications in cutaneous malignant melanoma: EZH2, H3K4me2, and H3K27me3 immunohistochemical expression is enhanced at the invasion front of the tumor. *Am J Dermatopathol*.**2015**;37:138-144.
85. **Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al.** A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*.**2005**;65:9328-9337.
86. **Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, et al.** ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells*.**2012**;30:2100-2113.
87. **Simbulan-Rosenthal CM, Dougherty R, Vakili S, et al.** CRISPR-Cas9 Knockdown and Induced Expression of CD133 Reveal Essential Roles in Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancers (Basel)*.**2019**;11.
88. **Nordvig AS, Owens DM, Morris RJ.** CD133 in the selection of epidermal stem cells in mice: steps in the right direction. *J Invest Dermatol*.**2012**;132:2492-2494.
89. **Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al.** MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol*.**2013**;14:249-256.
90. **Javelaud D, Alexaki VI, Pierrat MJ, et al.** GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*.**2011**;24:932-943.
91. **Das S, Harris LG, Metge BJ, et al.** The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *J Biol Chem*.**2009**;284:22888-22897.
92. **Duan F, Lin M, Li C, et al.** Effects of inhibition of hedgehog signaling on cell growth and migration of uveal melanoma cells. *Cancer Biol Ther*.**2014**;15:544-559.
93. **Nakamura S, Umezawa H.** Structure of azomycin (2-nitro-imidazole). *J Antibiot (Tokyo)*.**1955**;8:66.

94. **Marcus Y, Tal N, Ronen M, Carmieli R, Gurevitz M.** The drug ornidazole inhibits photosynthesis in a different mechanism described for protozoa and anaerobic bacteria. *Biochem J.***2016**;473:4413-4426.
95. **Edwards DI.** Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.***1993**; 31:9-20.
96. **Clark AG, Vignjevic DM.** Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.***2015**;36:13-22.
97. **Stecca B, Mas C, Clement V, et al.** Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.***2007**;104:5895-5900.
98. **Larsen AR, Bai RY, Chung JH, et al.** Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. *Mol Cancer Ther.***2015**;14:3-13.
99. **Feng X, Yu Y, He S, et al.** Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Lett.***2017**;385:12-20.
100. **Donato AL, Huang Q, Liu X, Li F, Zimmerman MA, Li CY.** Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy. *J Invest Dermatol.***2014**;134:1686-1692.
101. **Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY.** Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer.***2018**; 143:921-930.
102. **Evyapan G. AG, Cömertpay G., Lüleyap H.Ü.** Role of endoplasmic reticulum stress response in tumorigenesis. **2019**; 44 (1):241-248.
103. **Hassan M, Selimovic D, Hannig M, Haikel Y, Brodell RT, Megahed M.** Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World J Exp Med.***2015**; 5:206-217.
104. **Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, et al.** Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep.***2016**; 15:1660-1672.
105. **Chang CH, Bijian K, Qiu D, et al.** Endosomal sorting and c-Cbl targeting of paxillin to autophagosomes regulate cell-matrix adhesion turnover in human breast cancer cells. *Oncotarget.***2017**; 8:31199-31214.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında Perihan Üçgül Anadolu Lisesinden mezun oldu. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2009 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programından mezun oldu. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora programına başladı. Bu süreç içerisinde 2018 yılında Fransa’da IGBMC’de (L’Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire-Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology) 3 farklı projede yer aldı ve otizm ile ilgili çalıştı. Halen Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda kanser kök hücresi ile ilgili çalışmalarına devam etmektedir.